



HEVs

haute école valaisanne
hochschule wallis
sciences de l'ingénieur

Filière Technologies du vivant

Orientation Chimie analytique

Diplôme 2006

Christèle Bastian

*Extraction, concentration
et caractérisation
des composés polyphénoliques
du café vert*

Professeur

Urban Frey

Expert

Ennio Cantergiani



HEVs

Route du Rawyl 47
1950 Sion 2

haute école valaisanne
hochschule wallis

HES-HEVS-T (Sion)



EM000005224520

Sion, le 24 novembre 2006

TV/3006/43



Hes-so

Haute Ecole Spécialisée
de Suisse occidentale
Fachhochschule Westschweiz
University of Applied Sciences
Western Switzerland

Extraction, concentration et caractérisation des composés polyphénoliques du café vert
Extraktion, Konzentrierung und Charakterisierung von phenolischen Verbindungen im Rohkaffee

Objectifs:

Le pouvoir antioxydant des extraits de café vert est principalement dû à la présence de composés polyphénoliques dont les teneurs diminuent fortement à la torréfaction. Le but du travail est alors d'extraire un maximum de ces composants pour les réintroduire dans le café une fois torréfié afin de commercialiser un café «wellness».

Résumé:

Durant ce travail, les grains de café vert ont été soumis à des extractions par solvant accéléré ainsi qu'à des macérations agitées. Il s'est avéré que les paramètres optimaux déterminés pour un type d'extraction n'étaient pas les mêmes que pour l'autre type. Grâce à l'extrait obtenu, le taux de matière sèche extrait à partir des grains de café a été calculé: il est respectivement de 15 et 17 % pour le Robusta et l'Arabica. Les extraits ont été concentrés et analysés par HPLC-UV-MS. Les 3-, 4- et 5-CQA, le 5-FQA, le 3,4-diCQA et le 3,5-diCQA ont été quantifiés. La quantité minimale de ces composés se situe entre 7-9 % dans la plante sèche et 23-30 % dans la matière sèche. Un process a alors été mis en place et un taux de recouvrement de 30 % a été obtenu. La stabilité des composés polyphénoliques a été évaluée à 100 °C et il a été constaté que la diminution des concentrations était minime. Finalement, la valeur EC₅₀ des extraits de café vert a été mesurée et il s'est avéré que le Robusta possède une activité anti-radicalaire plus élevée que les extraits d'Arabica. Les résultats ont été comparés avec ceux fournis par un échantillon commercial d'extrait de café vert.

Mots clefs: Café vert, pouvoir antioxydant, composés polyphénoliques, acide chlorogénique, HPLC-MS, Robusta, Arabica, DPPH.

Objektiven:

Die oxydationshemmende Wirkung der Extrakte von Rohkaffee ist hauptsächlich auf die Anwesenheit von polyphenolischen Verbindungen zurückzuführen. Ihr Gehalt nimmt beim Rösten stark ab. Das Ziel der Arbeit ist somit, die maximale Extraktion dieser Bestandteile um sie anschließend im einmal gerösteten Kaffee wieder einzuführen, und daraus einen „wellness“ Kaffee zu machen.

Zusammenfassung:

Während dieser Arbeit wurden die Bohnen von Rohkaffee mehreren beschleunigten Lösemittelextraktionen sowie Mazerationen unterworfen. Es hat sich herausgestellt, dass die für den einen Kaffee ermittelten optimalen Parameter, für den anderen nicht die gleichen waren. Mit Hilfe des erhaltenen Extrakts konnte der Gehalt an Trockenmasse der Kaffeebohnen berechnet werden. Sie beträgt 15 bzw. 17 % für Robusta und Arabica. Die Extrakte sind danach konzentriert und mit HPLC-UV-MS analysiert worden. Die folgenden Verbindungen sind quantifiziert worden: die 3, 4 - und 5-CQA, die 5-FQA, die 3,4-diCQA und die 3,5-diCQA. Der gefundene Mindestgehalt an polyphenolischen Verbindungen liegt zwischen 7-9% getrocknete Pflanze und 23-30% trocken Masse. Des Weiteren wurde beim „process“, der mit Robusta durchgeführt wurde, eine Ausbeute von 30% erhalten. Stabilitätstests gegenüber der Temperatur sind durchgeführt worden und es konnte festgestellt werden, dass die Verminderung den Konzentrationen klein ist. Schließlich ist der Wert EC₅₀ der Extrakte von Rohkaffee gemessen worden, und es hat sich erwiesen, dass Robusta eine höhere anti-radikalische Aktivität besitzt als die Arabica -Extrakte. Alle Resultate werden mit einem kommerziellen Extrakt von Rohkaffee verglichen.

Schlüsselwörter: Rohkaffee, oxydationshemmende Wirkung, polyphenolische Verbindungen, Chlorogensäure, HPLC-MS, Robusta, Arabica, DPPH.

Table des matières

1	INTRODUCTION	4
2	PARTIE THEORIQUE	4
2.1	Le café vert	4
2.1.1	Le caféier	4
2.1.2	La technologie des cafés verts	6
2.1.3	La composition chimique du café vert	6
2.1.3.1	<i>Les acides-phénols</i>	8
2.1.4	La torréfaction	10
2.2	La méthode analytique adéquate	10
2.2.1	La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse	10
3	MATERIEL	12
3.1	Equipement	12
3.2	Réactifs et toxicologie	13
4	METHODES	14
4.1	Préparation des échantillons de café vert	14
4.2	Extraction des composés polyphénoliques	14
4.2.1	Extraction par solvant accéléré	14
4.2.2	Extraction par macération agitée	14
4.2.3	Process Robusta	15
4.3	Caractérisation des extraits de café vert	15
4.3.1	Teneur en eau résiduelle	15
4.3.2	Détermination du pH des extraits obtenus lors des épuisements	15
4.3.3	Détermination de la matière sèche (DM) des extraits	16
4.3.4	Concentration du surnageant des macérations agitées	16
4.3.5	Détermination de la teneur en principes actifs de la matière sèche	16
4.3.6	Test de stabilité des acides chlorogéniques à 100 °C	16
4.3.7	Dosage par la méthode HPLC-UV-MS	16
4.3.8	Dosage par la méthode HPLC-DAD	18
4.3.9	Mesure de l'activité anti-radicalaire	18
5	RESULTATS ET DISCUSSION	19
5.1	Broyage et stockage des grains de café vert moulus	19
5.2	Détermination de la teneur en eau résiduelle	20
5.3	Optimisation de l'extraction par solvant accéléré	20
5.3.1	Optimisation de la teneur en éthanol du solvant d'extraction	21
5.3.2	Optimisation de la température d'extraction	23
5.3.3	Optimisation de la taille de la mouture	24
5.4	Optimisation de l'extraction par macération agitée	26
5.5	Détermination de la matière sèche	30
5.6	Détermination qualitative des composés polyphénoliques et de la caféine	30
5.7	Détermination quantitative des composés polyphénoliques et de la caféine	36
5.8	Epuisement	37
5.9	Détermination de la teneur en principes actifs de la plante sèche	38
5.10	Détermination de la teneur en principes actifs de la matière sèche	39

5.11	Test de stabilité des composés polyphénoliques à 100 °C	40
5.12	Process Robusta	42
5.13	Activité anti-radicalaire des extraits de café vert	43
6	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	45
7	REMERCIEMENTS	46
8	BIBLIOGRAPHIE	47
8.1	Publications et ouvrages	47
8.2	Brevets	48
9	ANNEXES	49

Abréviations utilisées

MeOH	Méthanol
ETOH	Ethanol
M	Masse molaire
HPLC	Chromatographie liquide à haute pression
MPLC	Chromatographie liquide à moyenne pression
GC	Chromatographie gazeuse
MS	Spectromètre de masse
UV	Ultra violet
DAD	Détecteur à barrette de diodes (Diode Array Detector)
FAB	Bombardement rapide d'atome (Fast Atom Bombardment)
APCI	Ionisation chimique à pression ambiante
CI	Ionisation chimique
ASE	Extraction par solvant accéléré
RC 1	Calorimètre de réaction (réacteur)
PS	Plante sèche
DM	Matière sèche (Dry Matter)
DPPH	Diphényl-2,2-pyridyl-1-hydrazyle
AQ	Acide quinique
AC	Acide caféique
AF	Acide férulique
3-CQA	Acide 3-caféyl-quinique
4-CQA	Acide 4-caféyl-quinique
5-CQA	Acide 5-caféyl-quinique
5-FQA	Acide 5-féruloyl-quinique
3,4-diCQA	Acide 3,4-dicaféyl-quinique
3,5-diCQA	Acide 3,5-dicaféyl-quinique
4,5-diCQA	Acide 4,5-dicaféyl-quinique
S	Signal chromatographique
N	Bruit de fond
RMN	Résonance magnétique nucléaire

1 INTRODUCTION

De récentes études ont démontré que les extraits du café vert possèdent un pouvoir antioxydant comparable à celui que l'on peut retrouver dans les extraits de thé vert. Ce pouvoir est principalement dû à la présence, dans le café vert, de composés polyphénoliques tels les acides caféyl-quiniques, féruloyl-quiniques et dicaféyl-quiniques. La teneur en ces composés peut varier d'un café à l'autre suivant de quelle espèce il s'agit ou du type de traitement qui lui a été infligé. En effet, ces derniers sont très sensibles à l'oxydation et à la chaleur. Ainsi, lorsque le café vert est torréfié, les teneurs en composés antioxydants diminuent fortement car ces substances supportent difficilement de hautes températures. Le but du travail est alors d'extraire un maximum de ces composants du café vert pour les réintroduire dans le café une fois torréfié afin de commercialiser un café «bien-être». Il est important de pouvoir quantifier ces divers composés et pour ce faire, la chromatographie en phase liquide couplée à un spectromètre de masse se révèle être la méthode appropriée.

2 PARTIE THEORIQUE

2.1 Le café vert

2.1.1 Le caféier

Originaire d'Ethiopie et de la Corne d'Afrique, le caféier constitue le genre *Coffea* (créé par C. Linné) et appartient à la grande famille des Rubiacées qui comprend plus de 500 genres et 6000 espèces, pour la plupart tropicales. Il existe au moins 25 espèces différentes de *Coffea*, toutes indigènes d'Afrique tropicale et de certaines îles de l'océan Indien [1].

Deux espèces majeures fournissent l'essentiel du café marchand: *Coffea arabica*, le seul café qui se boit sans mélange et *Coffea canephora*, ou, plus précisément, *C. canephora* var. *robusta*, qui est parfois utilisé pour corser l'Arabica [1].

Les caféiers de type Arabica sont des arbustes de 8 à 10 m de hauteur possédant des feuilles entières (10-15 x 4-6 cm) persistantes, coriaces et luisantes. Les fleurs blanches et odorantes (parfum jasminé) sont groupées en verticilles à l'aisselle des feuilles (figure 1) [2]. Le fruit est une drupe verte, devenant rouge à maturité, renfermant habituellement deux graines plan-convexes accolés par leur face plane. Chaque graine est protégée par deux enveloppes; la première, l'endocarpe, est mince à structure scléreuse (parche), la seconde, le péricarpe, est une très fine membrane (pellicule ou pellicule argentée) plus ou moins adhérente à la graine (figure 2). La graine (la fève en langage commercial) est de couleur gris-jaunâtre à gris ardoisé, plus ou moins bleuté ou gris-verdâtre, selon les variétés, le mode de préparation, le milieu et le temps de conservation. Les dimensions et la forme des graines diffèrent avec les variétés, les conditions du milieu et de culture; elles ont, en moyenne, 10 mm de longueur, 6 à 7 mm de largeur et 3 à 4 mm d'épaisseur; leur poids oscille autour de 0.15 à 0.20 g [2].



Figure 1: Fleurs blanches et fruits du caféier (cerises) [1]

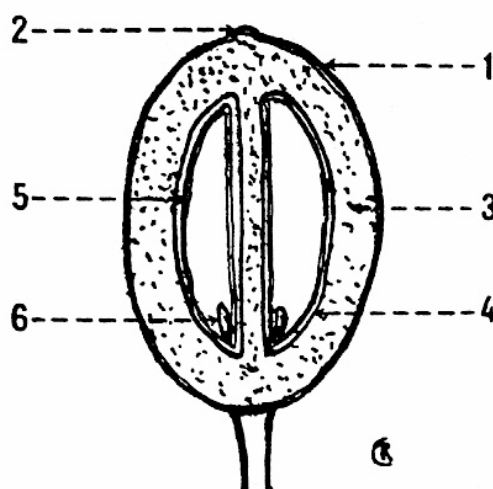


Figure 2: Coupe schématique du fruit du caféier (*C. arabica*)
1. Epicarpe (peau); 2. Disque; 3. Mésocarpe (pulpe);
4. Endocarpe (parche); 5. Tégument séminal (pellicule); 6. Embryon [2]

Le caféier de type *C. canephora* est un arbuste à feuillage persistant atteignant 8 à 12 m de hauteur. Les feuilles sont grandes: 20 à 35 cm de long et 8 à 15 cm de large. Le fruit est aussi rouge à maturité; les grains sont plan-ovoïde, de dimensions assez variables, mais généralement légèrement plus petits que ceux d'Arabica. Le Robusta est la variété cultivée la plus répandue dans le monde puisqu'il constitue au moins 95 % des plantations. Sa culture connaît un certain succès dans les régions du nord du Brésil, au climat chaud et humide, peu favorable à l'espèce *C. arabica* [2].

D'une façon générale, comparé au *C. arabica*, le *C. canephora* est d'une croissance plus vigoureuse et d'une productivité plus grande; l'espèce est aussi plus robuste et moins sensible

aux maladies. On notera que la teneur de cette espèce en caféine est supérieure à celle de *C. arabica* [2].

2.1.2 La technologie des cafés verts

Les fruits mûrs du caféier sont traités sur les lieux mêmes de production. Ils subissent un certain nombre d'opérations qui ont pour objet de dégager les grains de leurs enveloppes (pulpe, mucilage, pellicule) et d'améliorer leur présentation [2].

Pour obtenir le grain marchand, on a recours à l'une des deux techniques suivantes:

- La voie humide dans laquelle l'usinage des fruits frais s'effectue en trois temps:
 - a) Elimination de la pulpe (dépulpage) et du mucilage (couche riche en pectine adhérent à la parche et empêchant un séchage rapide des grains) (démucilagination), lavage
 - b) Séchage du café-parche
 - c) Elimination des enveloppes internes, parche et pellicule (déparchage) [2]
- La voie sèche qui se résume en deux temps:
 - a) Séchage des fruits (café en cerise ou café coque)
 - b) Elimination des enveloppes desséchées en une seule opération mécanique (décorticage) [2]

La technique de préparation des cafés, les soins apportés à ce travail ainsi qu'à la conservation des lots avant l'expédition ont également une incidence sur l'aspect du grain (dépelliculage plus ou moins complet par exemple), notamment sur sa couleur (excès de fermentation, séchage insuffisant ou irrégulier) [2].

Au point de vue commercial, ces critères apparents sont extrêmement importants. Ils définissent, en quelque sorte, l'identité d'un lot, c'est-à-dire, sa nature botanique, son origine géographique, son mode de préparation, son ancienneté ainsi que ses conditions de conservation [2].

2.1.3 La composition chimique du café vert

A la suite d'une étude succincte, les principaux constituants du café vert ont été déterminés:

Eau: La proportion d'eau du café vert est très variable suivant les échantillons, particulièrement en fonction des traitements subis. Elle oscille entre 10 et 18 % avec une valeur courante de 10 à 13 %, la limite inférieure étant difficile à abaisser lors du séchage. L'eau a évidemment un rôle déterminant sur la conservation et la torréfaction [3].

Matière minérale: La teneur en cendres des cafés est en moyenne de 3 à 4 % du café vert; elles renferment principalement du potassium, du sodium, du calcium, du magnésium, du phosphore et du soufre. On a également relevé la présence de nombreux oligo-éléments: fer, aluminium, cuivre, iode, fluor, bore et manganèse [2].

Protides: Les cafés verts renferment de 1 à 3 % d'azote total, engagé dans diverses combinaisons, dont les principales sont des protides et des alcaloïdes. Les acides aminés en général et certains aminoacides soufrés (cystine, méthionine en particulier), contenus dans les protides du café jouent un rôle important dans la formation de l'arôme du café torréfié. Rappelons que la teneur en protéine s'élève à 10-12 % de la matière sèche [2].

Alcaloïdes et autres substances azotées non protidiques: Le principal alcaloïde du café est la caféine; elle est accompagnée, en moindre quantité, d'autres bases azotées: la bétaine, la choline et surtout la trigonelline (0.4-1.2 %). Les cafés verts contiennent généralement de 1 à 2.5 % de caféine. Les Arabica sont les moins riches avec en moyenne 0.8 à 1.5 %, tandis que chez les Canephora, la teneur varie en moyenne entre 1.6 et 2.2 %; certains atteignent 2.8 % et dépassent même 3 %. La caféine ou 1, 3, 7-triméthylxanthine (figure 3) existe également, non seulement dans les constituants du fruit (pulpe 0.9 %), mais aussi dans les différentes parties du caféier (feuilles) et dans certains produits végétaux comme le thé (1 à 4 %) [2].

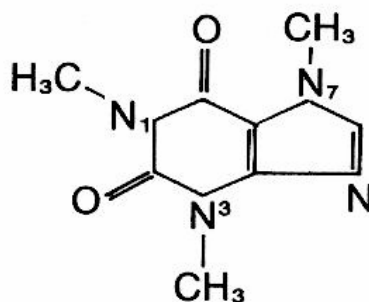


Figure 3: Caféine: 1, 3, 7-triméthylxanthine ($C_8H_{10}N_4O_2$) [2]

Lipides: Le café contient de la matière grasse riche en substances insaponifiables, non éliminées par les procédés courants de raffinage; ce fait la rend impropre à de nombreux usages, notamment alimentaire. Cette fraction insaponifiable des lipides bruts est importante (plus de 10 %): à côté de stérols, d'hydrocarbure, de tocophérols, on note la présence d'alcools diterpéniques (cafestol, kahweol, et dérivés kauraniques) qui existent à l'état libre et surtout, à l'état d'esters d'acides gras. On peut considérer que les Arabica sont des cafés riches en huile (12 à 18 %); les Robusta en contiennent relativement moins (9 à 14 %) [2].

Glucides: Les glucides représentent dans les grains de cafés verts plus de la moitié de la matière sèche et parmi ceux-ci les polysaccharides sont les plus largement représentatifs (plus de 40 %), alors que les oligosaccharides et les monosaccharides n'atteignent respectivement que 5 et 1 %. Ils ne semblent pas cependant jouer un rôle fondamental dans les qualités de la boisson; ils lui apportent surtout la couleur et la saveur «caramel» qui est caractéristique d'autres produits torréfiés. Le café vert renferme de petites quantités de sucres réducteurs libres (surtout glucose) et du saccharose (5 à 8 %), oligosaccharide de loin le plus abondant [2].

Acides aliphatiques et polyphénols: Les grains de café contiennent notamment divers acides organiques aliphatiques mais surtout des acides-phénols (acide quinique (**AQ**), acide caféique (**AC**) et acide chlorogénique (**5-CQA**)) qui présentent les caractères des tanins. Les phénols

non tanins (phénols simples et flavonoïdes) sont distingués des phénols tanins (tanins condensés et hydrolysables). Les acides hydroxycinnamiques sont particulièrement représentés dans les grains, sous forme surtout d'acides chlorogéniques (4 à 8 %) à l'état de chlorogénate double de caféine et de potassium. Ces composés seraient en grande partie détruits au cours de la torréfaction avec la libération de l'alcaloïde (caféine) [2].

Lors de l'examen par microscopie électronique à transmission de la structure fine d'un grain de café vert Robusta, il est possible de déterminer la localisation des diverses substances dans une cellule de stockage (figure 4) des tissus de réserve des cotylédons (partie de l'embryon). Ainsi, les lipides sont localisés à proximité de la membrane cytoplasmique et les acides chlorogéniques entre la paroi cellulaire et la membrane plasmique sur lesquels la caféine y est probablement fixée [4].

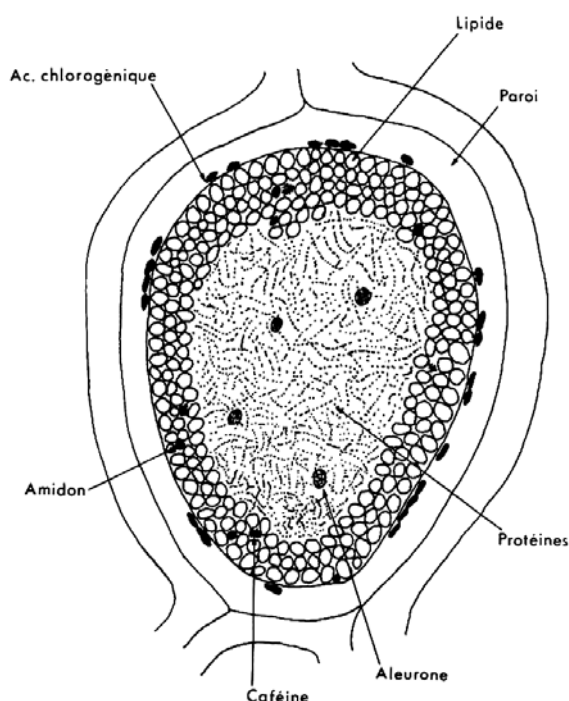


Figure 4: Cellule de stockage des tissus de réserve des cotylédons [4]

2.1.3.1 Les acides-phénols

Le terme d'acide-phénol peut s'appliquer à tous les composés organiques possédant au moins une fonction carboxylique et un hydroxyle phénolique. La pratique courante en phytochimie conduit à réserver l'emploi de cette dénomination aux seuls dérivés des acides benzoïques (acides-phénols en C₆-C₁) et cinnamiques (acides-phénols en C₆-C₃). La plupart de ces derniers (acide caféique, acide férulique (**AF**)) ont une distribution très large. Rarement libres, ou alors ce sont des artefacts d'extraction, ils sont souvent estérifiés: esters d'alcools aliphatiques et esters de l'acide quinique (acide chlorogénique fréquent) [5].

Les dérivés des acides hydroxycinnamiques ont une action anticancérigène et préviennent les maladies chroniques, cardiovasculaires et cérébrovasculaires [6] [7] [A]. Ils possèdent notamment un grand pouvoir antioxydant, c'est-à-dire qu'ils neutralisent les radicaux libres endommageant les cellules, ce qui a pour effet de renforcer les défenses immunitaires [B]. De plus, certains composés polyphénoliques sont des agents antibiotiques, antidiarrhéiques, antiulcéreux et anti-inflammatoires. Ils peuvent ainsi être utilisés dans le traitement des maladies comme l'hypertension, la faiblesse vasculaire, les allergies et l'hypercholestérolémie [7]. Les polyphénols ont aussi le potentiel de prévenir la génotoxicité en réduisant l'exposition aux facteurs oxydatifs et cancérogènes [7]. Les composés principaux des dérivés des acides hydroxycinnamiques sont illustrés dans la figure suivante:

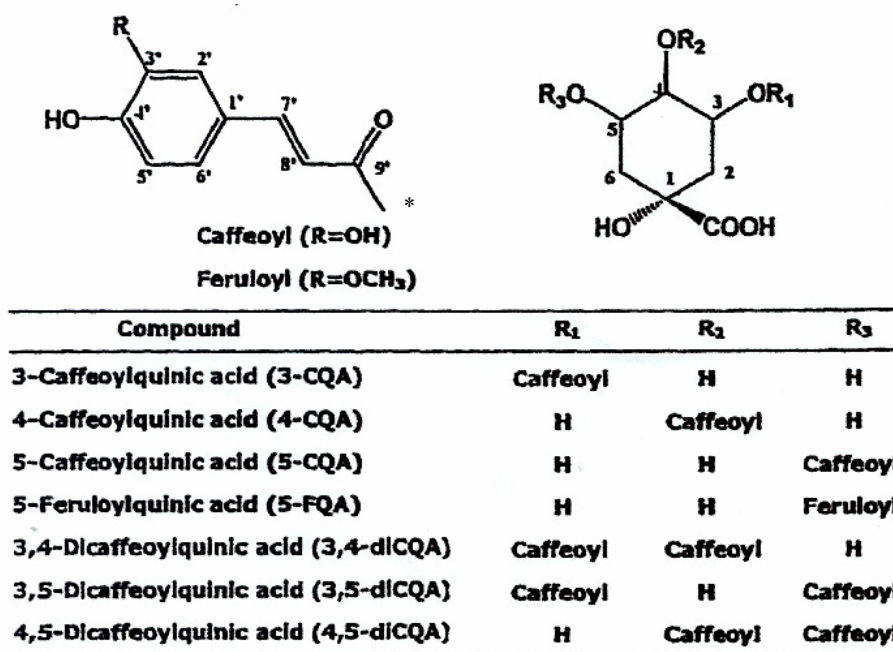


Figure 5: Structure chimique des principaux composants des dérivés des acides hydroxycinnamiques dans les grains de café vert [8]

Les acides caféyl-quiniques sont formés par l'estérification de l'AQ (figure 5, molécule de droite avec R₁, R₂, R₃ = H) avec un ou deux AC (figure 5, molécule de gauche, R = OH et position * = OH) [C]. Notons que ces composés n'ont pas de valeurs nutritionnelles et que leur activité antioxydante est due à la partie *o*-quinone [9]. De plus, la dégradation thermique des acides chlorogéniques en composés phénoliques contribue à l'amertume du café [10]. Les quantités d'acides caféyl-quiniques et dicaféyl-quiniques déterminent aussi la qualité et la maturité des grains de café: la quantité d'acides caféyl-quiniques augmente avec la maturité tandis que celle d'acides dicaféyl-quiniques diminue [8]. En outre, des quantités trop élevées d'acides dicaféyl-quiniques seraient la cause d'une saveur astringente [D] et d'une dépréciation de la qualité du breuvage [2]. Les composés polyphénoliques possèdent aussi quelques applications industrielles lors de la production de peintures, de papier, de cosmétiques [E] [F], d'agents tanniques et dans l'industrie alimentaire comme colorant naturel et agent conservateur [7] [G] [H].

2.1.4 La torréfaction

Les qualités aromatiques du café n'apparaissent et ne se développent que sous l'action des hautes températures auxquelles il est soumis au cours d'une pyrolyse ou torréfaction. En dehors des modifications que subissent son aspect extérieur (couleur, volume) et sa texture pendant cette opération, le produit est le siège de transformations chimiques profondes, dont certaines sont génératrices de l'arôme et du goût particulier du café [2] [I].

L'action des températures progressivement élevées sur le café donne lieu aux constatations suivantes: vers 100 °C, la couleur verte des grains commence à virer au jaune; la dessiccation se traduit par un dégagement de vapeur d'eau et une odeur de pain grillé. L'arôme commence à se développer aux environs de 180 °C. A cette température, les gaz de combustion apparaissent sous forme de volutes blanches bleutées, avec dégagement de CO₂ et CO. L'arôme atteint alors son plein développement. Vers 300 °C, ils sont noirs, charbonneux, friables à une légère pression; l'arôme a totalement disparu. A ce stade excessif de la torréfaction, le café est carbonisé [2].

Les spécialistes situent la «zone de torréfaction» entre 185 et 240 °C, l'optimum étant entre 210 et 230 °C. Au-dessus commence la sur-torréfaction. La durée de la torréfaction est habituellement de 12 à 15 minutes. Notons alors que la température de torréfaction et la conduite de celle-ci ont une influence considérable sur les qualités du café [2]. Pour pouvoir déterminer cette dernière, la chromatographie en phase liquide couplée à un détecteur de masse (MS) se révèle être une méthode adéquate.

2.2 La méthode analytique adéquate

2.2.1 La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse

La chromatographie est une technique analytique qui permet la séparation des constituants d'un mélange en phase homogène liquide (et gazeuse). Le principe repose sur l'équilibre des concentrations des composés présents entre deux phases en contact: la phase stationnaire qui est emprisonnée dans la colonne et la phase mobile qui se déplace dans cette dernière. La séparation est basée sur l'entraînement différentiel des constituants présents dans la colonne. Ces derniers la parcourent avec des temps proportionnels à leurs propriétés intrinsèques (taille, structure) ou à leur affinité avec la phase stationnaire (polarité,...). A leur arrivée en bout de colonne, le détecteur mesure en continu la quantité de chacun des constituants présents [11].

Pour analyser un mélange, comme des produits naturels par exemple, on fait suivre un analyseur chromatographique par un spectromètre de masse. Les produits de la chromatographie doivent être introduits successivement dans le spectromètre sous forme gazeuse (GC-MS) ou sous forme d'un liquide (HPLC-MS) dont les ions peuvent être extraits par FAB (bombardement rapide d'atomes), électrospray, APCI (ionisation chimique à pression ambiante) ou d'autres techniques d'ionisation [12].

Le couplage avec la chromatographie liquide est délicat, du fait que pour faire de la spectrométrie de masse, il faut produire des ions en phase gazeuse. Le problème est encore compliqué par la nécessité de se débarrasser du solvant d'élution. Une méthode de couplage

HPLC-MS avec, comme technique d'ionisation, l'APCI est capable de faire face à des débits de l'ordre du ml/min sans nécessiter l'utilisation de diviseur de débit. L'introduction de l'entièreté de l'éluat dans l'interface a pour conséquence d'augmenter la sensibilité de détection de cette méthode [12].

L'APCI est une technique d'ionisation, comme son nom l'indique, qui fait appel à des réactions ion-molécule en phase gazeuse à pression atmosphérique. C'est donc une méthode analogue à la CI (ionisation chimique) où les ions primaires sont produits par des décharges Corona (source constante d'électrons qui ionise l'air ambiant et crée un plasma) sur un aérosol de solvant. Le principe d'une source APCI est illustré à la figure 6.

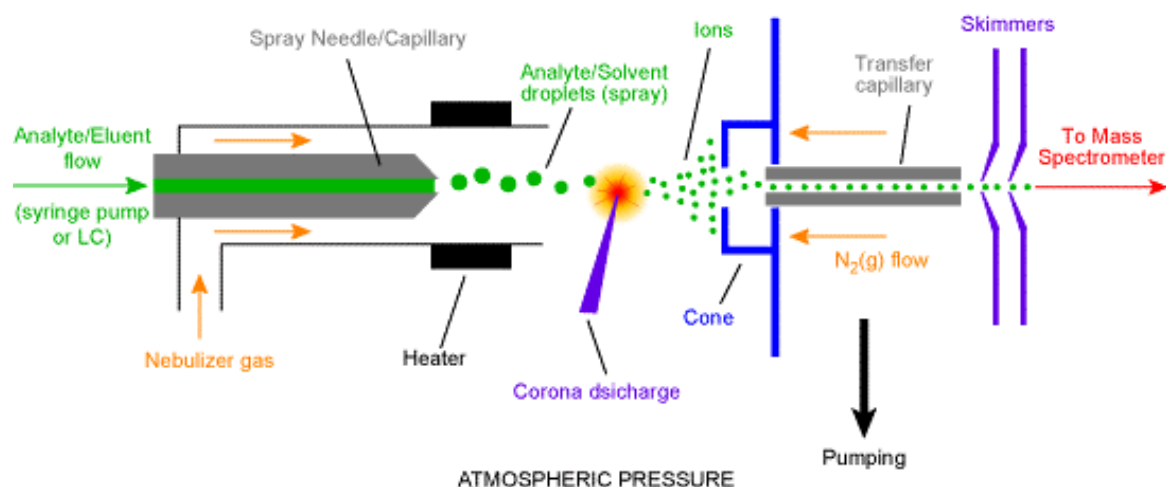


Figure 6: Schéma d'une source APCI [12]

L'éluat chromatographique est directement introduit dans un nébuliseur pneumatique où il est converti en un fin brouillard à l'aide d'un jet d'air ou d'azote à haute vitesse. Les gouttelettes sont alors déplacées par le flux gazeux au travers d'un tube de quartz chauffé. La chaleur transférée aux gouttelettes de l'aérosol va permettre la vaporisation de la phase mobile et de l'échantillon dans le courant de gaz. Le gaz chaud et les substances sortent de ce tube pour arriver dans la région de réaction de la source se trouvant à pression atmosphérique où ils sont ionisés chimiquement par transfert de proton en mode positif et par transfert d'électron ou de proton en mode négatif. En général, la phase mobile vaporisée joue le rôle de gaz ionisant en produisant des ions pseudomoléculaires représentés par $[M + H]^+$ en mode positif et des ions pseudomoléculaires $[M - H]^-$ en mode négatif [12].

L'ionisation du substrat est très efficace car elle se passe à pression atmosphérique où la fréquence des collisions est élevée. La désolvatation et vaporisation rapide des gouttelettes minimisent fortement la décomposition thermique et donc préserve l'espèce moléculaire [12].

3 MATERIEL

3.1 Equipement

- Matériel usuel de laboratoire de type analytique et organique
- Broyeur Retsch ZM 100 avec des tamis annulaires de 1.0, 0.75, 0.50, 0.25 mm
- Emballeuse sous vide VC 999/09 THDKN, Inauen Maschinen AG
- Sacs transparents pour mettre sous vide en Polyacrylate/Polyéthylène 20/70, Inauen Maschinen AG
- Extracteur par solvant accéléré (ASE) Dionex 2000
- Filtres en cellulose pour cellules d'extraction: D28 filter, taille 19.8 mm, Whatman S&S
- HPLC-UV Hewlett Packard Series 1100
- Détecteur à barrettes de diodes (DAD) Agilent HP 6890 series GC system
- Spectromètre de masse Hewlett Packard series 1100 MSD
- Colonne: CC 250-3 Nucleosil, 100-5 C18, Ser No 2050616, Batch 21301 143
- Evaporateur rotatif Heidolph Instruments Laborota 4011
- Centrifugeuse Labofuge 200, Heraeus Sepatech
- Centrifugeuse Hettisch Universal
- Mettler RC1 Reaction Calorimeter à double manteau
- Ultra Kryomat Landa
- Etuve Salvis munie d'une pompe à vide Müller & Krempel
- Seringues stériles sans latex à usage unique CE 0543, APS DK-4970, Codan Médical
- Filtres noirs certifiés sans métal avec membrane en PTFE, porosité 0.45 µm, Exapure TM, ALYS Technologies SA
- pH-mètre Metrohm 654 Swiss made CA 966
- Matériel usuel de halle alimentaire
- Brasseur Heidolph type RZR 1, n° 50111, 1/min 35-250/280-2200
- Pompe volumétrique à vis sans fin Stöber type RD11-1002-025-4
- Filtre à plaques Elva 79, Friedrich Frères SA
- Filtres Filtrox AF 31H
- Evaporateur rotatif de 20 l Heidolph Instruments Laborota 20 Control

3.2 Réactifs et toxicologie

Echantillons de grains de café vert *Coffea canephora* var. *robusta* provenant du Viêt-nam et de *Coffea arabica* provenant du Brésil fournis tous deux dans des sacs en papier carton d'une contenance de 10 kg par La Semeuse en mars 2006.

Tableau 1: Toxicologie des produits utilisés [13][14]

Nom et abréviation ()	Formule	Toxicités	Classe de toxicité	Provenance
Alcool absolu A 15 PA 99.9 % (ETOH)	C ₂ H ₅ OH	Facilement inflammable	F	UN 1170, 67/548/EWG Pharmacochimie SA
Acide chlorogénique min 95 % (5-CQA)	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	-	-	Sigma Aldrich C 3878
Acide formique 98 %	CH ₂ O ₂	Corrosif	3	Fluka 06440
Caféine anhydre purum > 99%	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	Toxique en cas d'ingestion	3	Fluka 27600
Coffee bean extract-P, Net wt. 3 g	-	-	-	Lot No M-528 Oryza oil & fat chemical CO., LTD
Diphényl-2,2-pycryl- 1-hydrazyle Approx 90 % (DPPH)	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	Nocif	-	Sigma Aldrich D 9132-16
Eau milli-Q	H ₂ O	-	F	Millipore, gradient A10
Méthanol HPLC 99.9 % (MeOH)	CH ₃ OH	Facilement inflammable, toxique	3	Cabscan analytical sciences, code C17C11X
Méthanol HPLC >99.8% (MeOH)	CH ₃ OH	Facilement inflammable, toxique	3	Merck 1.06018.2500 Lichrosolv
Tampon pH 4.00 ± 0.02 (20°C) pour analyse	C ₆ H ₈ O ₇ , HCl, NaOH	-	-	Carlo Erba 486271
Tampon pH 7.00 ± 0.02 (20°C) pour analyse	KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄	-	-	Carlo Erba 486451

4 METHODES

4.1 Préparation des échantillons de café vert

Les grains de café vert (Arabica et Robusta) sont broyés avec un tamis annulaire de 1.00, 0.75, 0.50 et 0.25 mm en fonction du type d'expérience choisi. Afin de faciliter l'opération, le broyage fin est effectué à partir de grains déjà broyés pour éviter une surchauffe du broyeur. Si le matériel n'est pas préparé fraîchement, le broyat est conservé (portions d'environ 100 g) dans des sacs transparents mis sous vide et à l'abri de la lumière. L'opération de broyage est accélérée en versant au préalable les grains de café dans de l'azote liquide.

4.2 Extraction des composés polyphénoliques

4.2.1 Extraction par solvant accéléré

Environ exactement 5 g de café broyé (point 4.1) et 5 g de terre diatomée sont pesés (Annexe 1) et homogénéisés avant leur introduction dans la cellule d'extraction. Des solutions aqueuses contenant des teneurs en éthanol de 20, 30, 40, 60 et 80 % sont testées pour l'extraction par solvant accéléré (ASE) à 40 °C avec une mouture de 1 mm. Différentes températures (tableau 2) sont aussi appliquées lors des extractions en utilisant un solvant contenant 40 % d'éthanol et une mouture de 1 mm. Différentes tailles de moutures obtenues par des tamis de: 1.00, 0.75, 0.50, 0.25 mm sont expérimentées par ASE avec un solvant contenant 40 % d'éthanol, une température de 80 °C pour Robusta et de 100 °C pour Arabica. Un épuisement (3 passages successifs dans la cellule) de chaque café est effectué avec un solvant contenant 40 % d'éthanol, une température de 40 °C et une mouture de 1 mm (Annexe 2).

Tableau 2: Paramètres utilisés lors de l'optimisation de l'extraction par solvant accéléré

Paramètres*	Robusta	Arabica
Températures [°C]	40, 60, 80, 100	40, 60, 80, 100, 120
Pression [bar]	100	100
Préchauffage [min]	0	0
Chauffage [min]	5	5
Extraction statique [min]	10	10
Flush volume [%]	60	60
Purge [s]	60	60

* La signification des paramètres est présentée en annexe 3.

4.2.2 Extraction par macération agitée

Environ exactement 100 g de café broyé (point 4.1) avec un tamis de 1 mm sont pesés (les pesées exactes sont fournies avec les essais respectifs) et introduits dans le RC1 une fois que

la solution aqueuse à 40 % d'éthanol a atteint la température de consigne. Un rapport drogue/solvant de 1:10 est appliqué. Différentes températures sont testées (tableau 3). Des prélèvements sont effectués toutes les heures pendant 8 heures. Le surnageant prélevé est centrifugé à 4000 t/min à un angle de 58° et dilué 100 fois. Le surplus du prélèvement est réintroduit dans le réacteur. Lors d'un essai à 40 °C, des prélèvements sont effectués chaque 10 min pendant 1 heure.

Tableau 3: Paramètres utilisés lors de l'optimisation de l'extraction par macération agitée

Paramètres	Robusta	Arabica
Températures [°C]	4, 25, 40, 80	4, 25, 40, 83
Rotation brasseur [rpm]	200	200

4.2.3 Process Robusta

2'022.6 g de café Robusta broyé avec un tamis de 1 mm (point 4.1), 11'999.6 g d'eau déminéralisée et 8'199.2 g d'éthanol sont pesés et introduits dans une cuve munie d'une toile filtrante. Le mélange est agité pendant une nuit. Pour récupérer l'extrait liquide, la toile est soulevée pendant 2 minutes et l'extrait est récupéré par égouttement → extrait 1. Puis, la toile contenant le marc est pressée → extrait 2. Le marc est à nouveau extrait pendant 1 heure dans une solution composée de 2'400.2 g d'eau déminéralisée et de 1'605.8 g d'éthanol. L'extrait liquide est récupéré en soulevant la toile comme cité précédemment → extrait 3. Cette dernière est pressée → extrait 4. Tous les extraits sont réunis et le tout est filtré sur filtre à plaques (13 plaques). Lorsque les plaques sont colmatées, elles sont remplacées. Le solvant est évaporé à l'aide de l'évaporateur rotatif avec une température du bain de 50°C, un vide de 100 mbars pour débiter puis de 40 mbars et une vitesse de rotation de la boule de 35 rpm. Le résidu gluant est récupéré avec un peu d'évaporat en chauffant à 50 °C. Le tout est placé dans une étuve à vide à 50 °C et 100 bars pendant 1 semaine. L'extrait sec est récupéré et homogénéisé avant d'être mis sous vide et placé au congélateur.

4.3 Caractérisation des extraits de café vert

4.3.1 Teneur en eau résiduelle

Plus ou moins exactement 2 g de café vert (Arabica et Robusta) broyé avec un tamis annulaire de 1 mm (point 4.1) sont pesés dans un cristalliseur (pesées exactes voir annexe 4), puis mis à l'étuve sous vide à 105 °C pendant 30 heures. Les échantillons sont refroidis dans un dessiccateur et pesés jusqu'à poids constant.

4.3.2 Détermination du pH des extraits obtenus lors des épuisements

Le pH-mètre est calibré avec les deux solutions tampon à pH 4 et 7. Les extraits obtenus lors des épuisements effectués sur chaque café sont mesurés (point 4.2.1).

4.3.3 Détermination de la matière sèche (DM) des extraits

Un volume de 5 ml d'extrait est pesé dans un petit cristalliseur taré, puis séché à 105 °C pendant trois heures. Ce dernier est refroidi dans un dessiccateur et pesé jusqu'à poids constant (Annexe 2).

4.3.4 Concentration du surnageant des macérations agitées

100 ml du surnageant de chaque macération agitée (Arabica et Robusta) effectuée à 40 °C sont prélevés. (Les données concernant ces macérations peuvent être consultées en annexe 5.) Le solvant est retiré à l'évaporateur rotatif avec une température du bain de 55°C et en augmentant progressivement le vide jusqu'au maximum. Le produit sec est récupéré et homogénéisé à l'aide d'un mortier. Les résidus secs ainsi que le solvant extrait sont analysés (point 4.3.7).

4.3.5 Détermination de la teneur en principes actifs de la matière sèche

Des solutions de 0.3 et 0.6 g/l de solide récupéré (point 4.3.4) des cafés Robusta, Arabica et d'un échantillon commercial d'extrait de grain de café (tableau 1) sont préparées. (Pesées exactes voir annexe 6). Pour le Robusta et l'échantillon commercial de l'extrait de café, la dilution est effectuée avec les concentrations de solvant utilisées au début du gradient de solvant à savoir MeOH/Acide formique 1%/H₂O 10:15:75 tandis que l'Arabica est dilué dans une solution de MeOH/eau 1:1. Les échantillons sont analysés avec la méthode analytique pour l'optimisation des extractions (point 4.3.7).

4.3.6 Test de stabilité des acides chlorogéniques à 100 °C

50 ml d'une solution aqueuse de 0.6 g/l de solide récupéré (point 4.3.4) des cafés Robusta, Arabica et d'un échantillon commercial d'extrait de grain de café sont préparés. (Pesées exactes voir annexe 7). Le bain à ultrason est utilisé pour accélérer la dissolution du solide. 40 ml de cette solution sont portés à reflux (100°C) pendant 15 min. La solution chauffée et les 10 ml restants sont analysés avec la méthode chromatographique optimisée (point 4.3.7).

4.3.7 Dosage par la méthode HPLC-UV-MS

Les échantillons sont généralement dilués 100 fois avec une solution MeOH/H₂O 1:1. Lors de l'optimisation de la séparation des isomères, les échantillons sont dilués 20 fois. Selon la nécessité, certains échantillons sont analysés avec une ionisation négative puis positive. De même que certains sont analysés à des longueurs d'ondes de 325 et 254 nm. Une calibration avec l'acide chlorogénique et de la caféine est effectuée pour la quantification (Annexe 8).

HPLC UV:*

- Colonne: CC 250/3 Nucleosil, 100-5 C18
- Phase mobile: méthanol, acide formique 1 %, eau (tableau 4)
- Débit: 0.7 ml/min
- Température: 25 °C
- Pression max: 400 bar
- Détecteur UV: 325 nm, 254 nm
- Volume d'injection: 50 µl
- Temps d'analyse: 25 min
- Temps d'attente après analyse: 7 min

Tableau 4: Gradient de solvant utilisé pour la méthode par HPLC-UV-MS

Temps [min]	MeOH [%]	Acide formique 1 % [%]	H₂O [%]
0	10	14.5	75.5
7	20	12.9	67.1
15	50	8.1	41.9
20	70	4.8	25.2
25	90	1.6	8.4

MS mode négatif:

- Ionisation: APCI
- Polarité: négative
- Mode: Scan
- Fragmenteur: 80
- Domaine de masse: 120-1500

Tableau 5: Substances, masses molaires et pics recherchés en MS à polarité négative [8]

Substances	Masse molaire [g/mol]	MS [M-1]⁻	Fragments issus de [M-1]⁻
3-CQA	354	353	191
4-CQA	354	353	191
5-CQA	354	353	191
5-FQA	368	367	191
3,4-diCQA	516	515	135, 173, 173, 179, 191, 353
3,5-diCQA	516	515	135, 173, 173, 179, 191, 353
4,5-diCQA	516	515	135, 173, 173, 179, 191, 353

MS mode positif:

- Ionisation: APCI
- Polarité: positive
- Mode: Scan
- Fragmenteur: 80
- Domaine de masse: 120-1500

Tableau 6: Substances, masses molaires et pics recherchés en MS à polarité positive [8]

Substances	Masse molaire [g/mol]	MS [M+1] ⁺	Fragments issus de [M+1] ⁺
Caféine	194	195	138
3-CQA	354	355	163
4-CQA	354	355	163
5-CQA	354	355	163
5-FQA	368	369	177
3,4-diCQA	516	517	163, 355
3,5-diCQA	516	517	163, 355
4,5-diCQA	516	517	163, 355

* Il s'agit ici de la méthode analytique développée pendant le travail de semestre, pour plus d'informations sur la détermination de cette dernière, consulter le rapport [15].

Préparation de l'HPLC-UV-MS lors de l'optimisation chromatographique:

Les paramètres restent identiques à ceux cités ci-dessus sauf pour ce qui concerne le gradient de solvant présenté au tableau 7.

Tableau 7: Gradient de solvant utilisé pour la méthode optimale en HPLC-UV-MS

Temps [min]	MeOH [%]	Acide formique 1 % [%]	H ₂ O [%]
0	10	14.5	75.5
7	20	12.9	67.1
12	30	11.2	58.8
20	40	9.6	50.4
28	50	8.1	41.9
33	60	6.4	33.6
37	70	4.8	25.2
42	90	1.6	8.4

4.3.8 Dosage par la méthode HPLC-DAD

Les échantillons sont dilués 100 fois avec une solution MeOH/H₂O 1:1 puis analysés à 325, 316 et 254 nm. Le reste des paramètres demeure identique à ceux présentés au point 4.3.7.

4.3.9 Mesure de l'activité anti-radicalaire

Des solutions de concentrations de 4.0, 2.0, 1.0, 0.5 et 0.25 mg/ml sont préparées à partir des extraits secs de Robusta, d'Arabica et d'un échantillon commercial d'extrait de grain de café (Annexe 9). 100 µl de ces solutions sont mélangés à 10 ml d'une solution méthanolique de 40 mg/l de DPPH. Il est attendu 30 min avant de mesurer l'absorbance à 517 nm. Un blanc est effectué au préalable avec la solution de 40 mg/ml.

5 RESULTATS ET DISCUSSION

De considérables progrès ont été effectués ces dernières années en ce qui concerne les analyses des composés polyphénoliques des extraits de café vert. La chromatographie liquide s'est révélée être une méthode indispensable pour caractériser et quantifier de manière précise des groupes polyphénoliques spécifiques [16]. Pour cela, il faut tout d'abord préparer le café pour qu'il puisse être soumis à une extraction dans les meilleures conditions. Puis, concentrer l'extrait obtenu dans le but d'en déterminer sa composition en % de la matière sèche.

5.1 Broyage et stockage des grains de café vert moulus

Lors de l'étude de la composition chimique des cafés verts Arabica et Robusta, les grains ont été broyés à l'aide de différents tamis annulaires allant d'une ouverture de maille de 1.00 à 0.25 mm (point 4.1). Avec l'utilisation d'une telle technique de broyage, il est tout à fait approprié de penser que les particules ne possèdent pas toutes la même taille. Il serait alors intéressant d'établir une distribution statistique de la dimension des particules mais ceci ne relève pas d'un intérêt majeur dans ce cas. Lors des manipulations, il a alors été remarqué que si l'introduction des grains était trop rapide ou trop volumineuse, une odeur de grillé ainsi que de la fumée s'échappaient du broyeur. Rappelons que la torréfaction détruit en grande partie les acides chlorogéniques. Le broyeur était alors totalement surchargé, c'est pourquoi une introduction de quelques grains à la fois a été privilégiée à défaut d'augmenter considérablement la durée de l'opération. En outre, lors de l'utilisation de tamis possédant une ouverture inférieure à 1.00 mm, il a été préférable d'introduire des grains déjà broyés plutôt que des grains entiers.

D'autres aspects d'une alimentation trop rapide ont été constatés lorsque le couvercle du broyeur a été ouvert: de l'eau s'était déposée autour de l'orifice d'introduction. Sa présence est expliquée par la dureté du grain qui rend le broyage sans perte d'eau difficile [17]. Il a aussi été remarqué que plus la quantité de grains broyés augmentait plus le tamis était encrassé par un dépôt de cire [18]. On désigne sous le vocable de cire la fraction lipidique externe de la graine (environ 2 %), formant un revêtement protecteur en surface. Notons que les cires contiennent des hydroxy-tryptamides peu stables qui constituent un indice de fraîcheur des cafés verts, la baisse de leur concentration étant parallèle au brunissement des grains, et dont le rôle physiologique serait celui d'antioxydant. Les cires externes des grains les protègent dans une certaine mesure contre les oxydations, mais les traitements des grains non broyés par le chloroforme visant à les éliminer affectent alors la conservation du café vert [3].

Une solution à tous ces problèmes est de disposer les grains dans de l'azote liquide avant le broyage ce qui permet d'éviter les phénomènes cités précédemment à savoir l'échauffement du grains, la surcharge de l'appareil, la perte d'eau ainsi que le colmatage du tamis. La durée des opérations en est aussi fortement diminuée.

Etant donné que la technique de broyage prend beaucoup de temps et que lors des manipulations il est préférable de travailler avec du matériel frais, il a été décidé de placer le broyat sous vide dans des sacs en plastique afin de limiter son oxydation. L'idéal aurait été d'utiliser des sacs en aluminium mais ces derniers représentent un coût assez élevé, c'est

pourquoi une alternative a été envisagée en conservant ces sacs en plastique à l'abri de la lumière dans un tiroir. Citons aussi que le café vert, malgré son aspect, est une matière assez hygroscopique, de conservation délicate, ceci étant plus marqué pour le café Arabica que pour le café Robusta [19].

5.2 Détermination de la teneur en eau résiduelle

Trois essais par type de café ont été effectués dans le but de déterminer la teneur en eau résiduelle des grains de café verts broyés de *Coffea canephora* var. *robusta* et de *Coffea arabica*. Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau 8 ci-dessous.

Tableau 8: Teneurs moyennes en plante sèche et en eau résiduelle du café vert broyé avec un tamis annulaire de 1 mm

	Robusta	Arabica
Plante sèche [%]	98.8	94.0
Teneur en eau résiduelle [%]	7.2	6.0

Les résultats des trois essais concernant chaque type de café démontrent ainsi une très bonne reproductibilité vu qu'un écart-type inférieur à 0.1 % est constaté entre les valeurs obtenues (Annexe 4). La teneur en eau résiduelle des grains de café broyés et séchés s'élève alors à environ 7 % pour les grains de Robusta et à 6 % pour ceux d'Arabica. La tendance est identique à celle citée dans la littérature, à savoir que les cafés verts Robusta contiennent plus d'eau que ceux d'Arabica [19] [20]. Il est difficile de donner ici précisément les valeurs attendues étant donné que selon l'origine et le stockage du café, la teneur en eau peut varier fortement: par exemple, on note des teneurs en eau de 8% pour un café Robusta provenant de Madagascar et de 13% pour un Robusta provenant de Côte d'Ivoire [19]. Rappelons toutefois que les cafés verts commercialisés accusent généralement une teneur en eau comprise entre 10 et 13 %. Au-dessus d'un taux de 12.5 %, la conservation des cafés est compromise, surtout en milieu humide, ils ne tardent généralement pas à moisir et à se décolorer. De plus, certains auteurs ont démontré que de lentes réactions chimiques modifient dans les cafés humides l'aptitude à fournir des produits torréfiés savoureux et aromatiques; ils estiment que cette altération est évitée lorsque la teneur en eau des grains est inférieure à 10 % [5]. Dans notre cas, ces phénomènes indésirables sembleraient alors être évités car cette teneur en eau est inférieure à la valeur critique de 10 %.

5.3 Optimisation de l'extraction par solvant accéléré

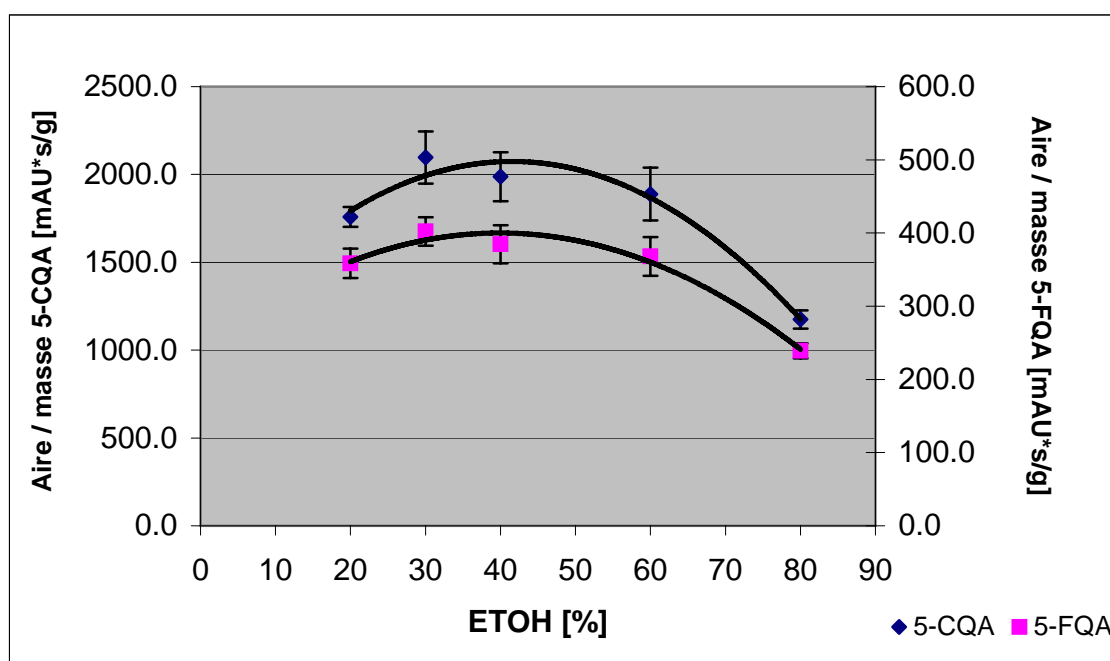
Vu l'instabilité des composés étudiés, l'extraction est conduite de préférence sur du matériel frais comme cité précédemment. L'extraction est alors effectuée avec une solution hydro-alcoolique, ce qui permet d'extraire moins de substances lipophiles et d'éviter une estérification partielle des acides-phénols [5] [J] [K]. L'éthanol a ainsi été choisi étant donné que les extraits risquent d'être utilisés dans l'industrie alimentaire. Notons que ce dernier augmente la solubilité et la dissociation des constituants colloïdaux intracellulaires ce qui accroît la pression dans la cellule et la fait éclater [21]. Compte tenu de la fragilité des composés polyphénoliques, il est recommandé de travailler sous atmosphère inerte et d'éviter

des pH excessifs car les esters cinnamiques d'hydroxy-acides (ex.: l'acide caféyl-quinique) s'isomérisent facilement, en milieu acide ou alcalin, pour donner des mélanges d'isomères de position [5]. Le pH a été mesuré sur les échantillons ayant été épuisés et il se situe entre 6.1 et 6.4 unités pH ce qui est proche de la neutralité (Annexe 10). Les extractions sont effectuées sous une pression de 100 bars car cette dernière assure une meilleure pénétration du solvant dans la matrice, augmente la température d'ébullition des solvants ainsi que les rendements d'extraction.

Dans le but de déterminer les paramètres optimaux de l'extraction par solvant accéléré, différents essais ont été effectués, tous à double, en variant tout d'abord la teneur en éthanol du solvant d'extraction, puis la température d'extraction et finalement la taille de la mouture. Les résultats exposés représentent les moyennes des essais et ont été traités de manière générale car le but de ces analyses était de pouvoir définir une méthode permettant d'extraire un maximum de composés à savoir l'acide caféyl-quinique (5-CQA) et l'acide féruloyl-quinique (5-FQA). C'est pourquoi, pour rendre les résultats comparables les uns avec les autres, il a été décidé que le facteur de comparaison serait principalement le rapport de l'aire du pic chromatographique en question sur la masse de café introduite dans la cellule d'extraction.

5.3.1 Optimisation de la teneur en éthanol du solvant d'extraction

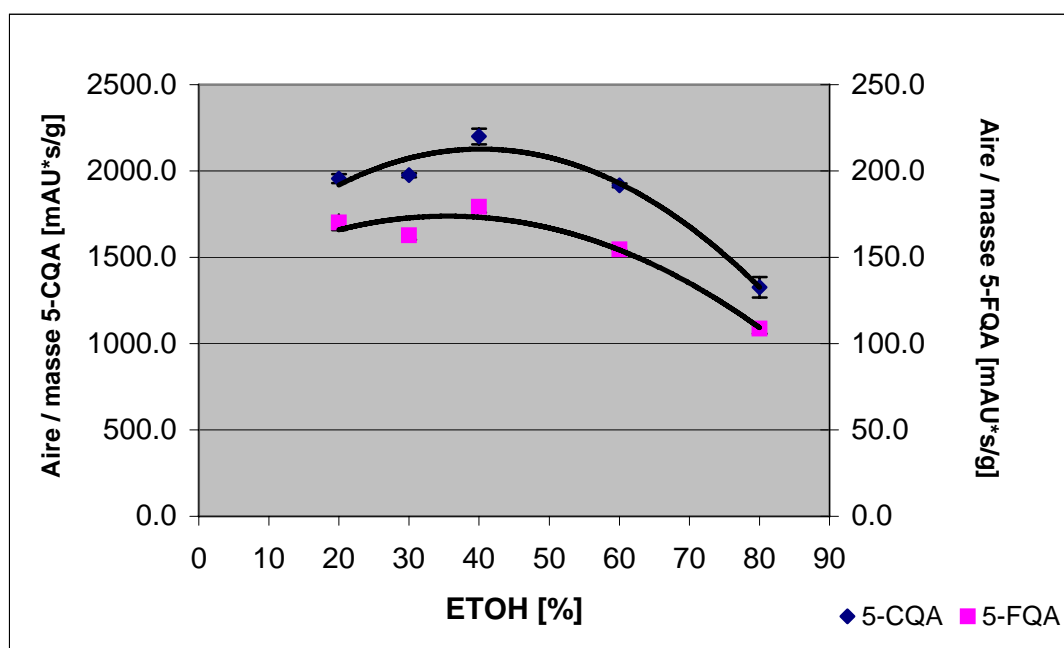
Les analyses sont effectuées avec une température de 40 °C, température habituellement utilisée lors des extractions de matières végétales, et avec une taille de mouture de 1 mm. Les résultats suivants concernant les types de cafés Robusta (graphique 1) et Arabica (graphique 2) ont pu être observés.



Graphique 1: Robusta: Détermination de la teneur optimale en éthanol

Les résultats détaillés (aires des pics, masses, moyennes, écart-types...) peuvent être consultés à l'annexe 11 dans laquelle les équations des courbes polynomiales de deuxième degré ainsi que les coefficients de corrélation sont inscrits.

L'affinité des deux composés polyphénoliques face à la teneur en éthanol (v/v) du solvant d'extraction semble être quasi identique étant donné que le profil des courbes de tendance se dessine de la même manière. Il est important de noter dès à présent l'existence de deux échelles, celle de gauche est reliée au rapport de l'aire du pic chromatographique sur la masse de café introduite obtenue pour 5-CQA, tandis que celle de droite est en relation avec le rapport aire/masse déterminé pour 5-FQA. Notons, de plus, que les barres d'erreur (écart-type) sont du même ordre de grandeur. On remarque d'ores et déjà que les extraits se composent d'une quantité plus élevée de 5-CQA que de 5-FQA, ceci se voit aisément lorsque l'on s'intéresse à l'aire des pics. Pour le choix du pourcentage d'éthanol idéal, il est possible de s'orienter vers des valeurs allant de 20 à 60 % (graphique 1). En effet, en considérant les valeurs des écart-types, on observe entre 20 et 60 % que très peu de divergences. Une teneur de 30 % en éthanol est très couramment utilisée dans le même type d'analyses. Ainsi, pour concorder avec l'optimum décrit par la courbe, une teneur en éthanol de 40 % a été retenue.



Graphique 2: Arabica: Détermination de la teneur optimale en éthanol

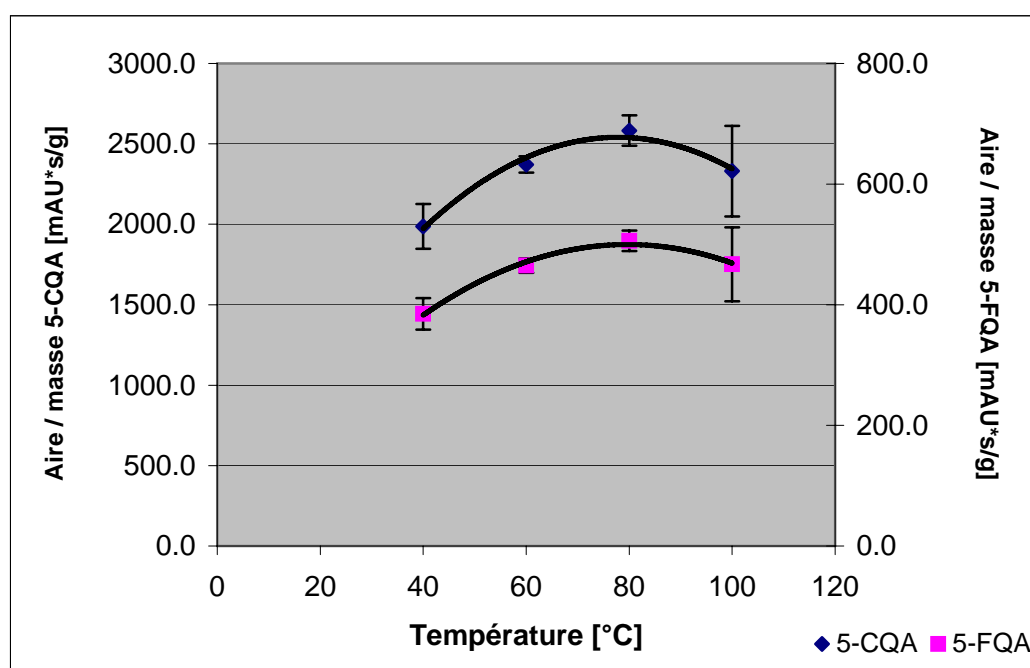
Les résultats détaillés (aires des pics, masses, moyennes, écart-types...) peuvent être consultés à l'annexe 11 dans laquelle les équations des courbes polynomiales de deuxième degré ainsi que les coefficients de corrélation figurent.

Des observations identiques à celles effectuées précédemment peuvent être considérées lorsqu'on se penche sur le graphique 2 et que l'on remarque qu'il est très similaire au n° 1. Seul bémol, il semblerait que les écart-types soient de plus faible valeur. Notons, par ailleurs,

que les échelles de gauche sont très similaires pour les deux types de café, ce qui laisse sous entendre que leurs concentrations face au 5-CQA sont assez proches. Par contre, la teneur en 5-FQA semble diverger entre les deux cafés.

5.3.2 Optimisation de la température d'extraction

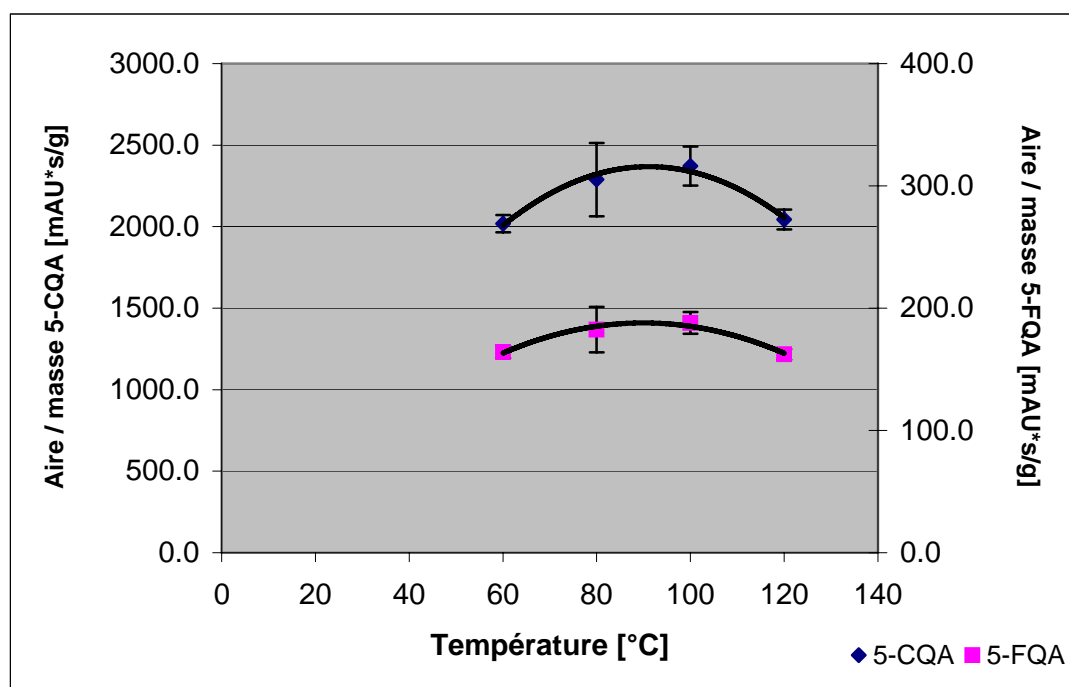
Dans le cadre de cette analyse, la teneur optimale en éthanol a été appliquée à toutes les extractions et la taille de la mouture utilisée est restée celle de 1 mm. Les observations suivantes ont pu être effectuées pour les cafés verts de type Robusta (graphique 3) et de type Arabica (graphique 4).



Graphique 3: Robusta: Détermination de la température d'extraction optimale

Les résultats détaillés (aires des pics, masses, moyennes, écart-types...) peuvent être consultés à l'annexe 12 dans laquelle les équations des courbes polynomiales de deuxième degré ainsi que les coefficients de corrélation sont inscrits.

Selon la forme de la courbe, il semblerait que la température optimale d'extraction pour les grains de café vert Robusta se situe aux alentours de 80 °C vu que les substances pures prises comme référence, l'acide caféyl-quinique et l'acide féruloyl-quinique, présentent un rapport aire/masse maximal. Si on considère la taille des écart-types, on peut en déduire qu'il n'y aurait que très peu de différence si l'on utilisait une température d'extraction un peu plus élevée, telle celle de 100 °C.



Graphique 4: Arabica: Détermination de la température d'extraction optimale

Les résultats détaillés (aires des pics, masses, moyennes, écart-types...) peuvent être consultés à l'annexe 12 dans laquelle les équations des courbes polynomiales de deuxième degré ainsi que les coefficients de corrélation figurent.

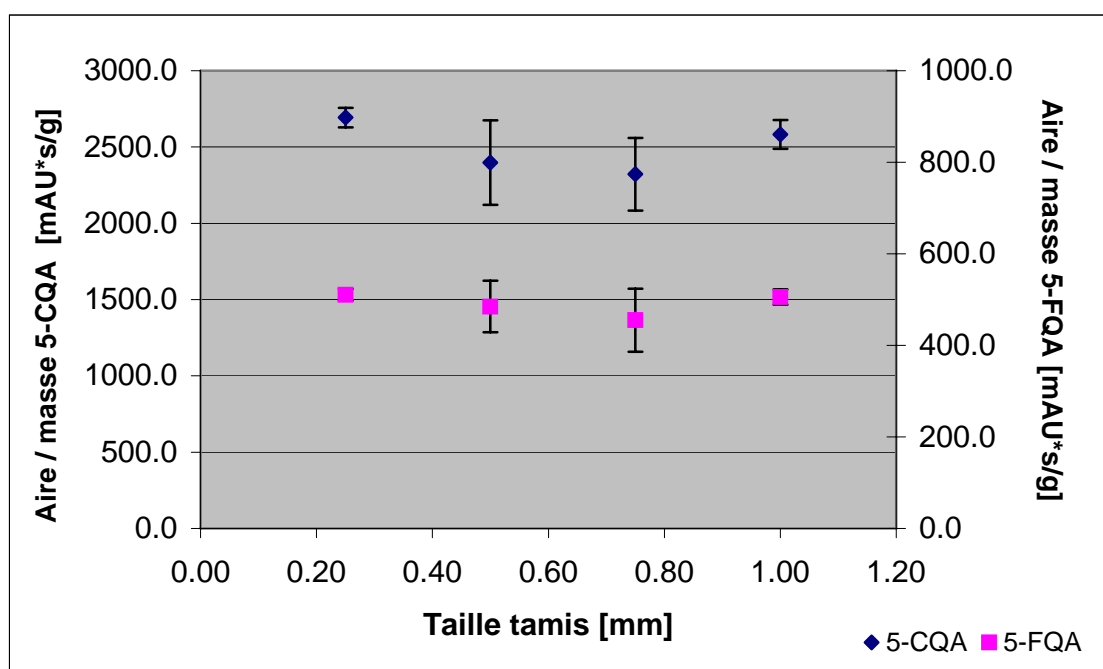
Dans le cas du café Arabica, la température optimale d'extraction se situe un peu plus haut que celle déterminée pour le Robusta avec quelques 100 °C. Ici, très peu de divergences sont constatées entre les températures de 80 et 100 °C.

Les résultats de cette optimisation présentent ainsi un domaine de température plus au moins restreint pouvant être utilisé pour extraire de manière idéale les composés choisis.

5.3.3 Optimisation de la taille de la mouture

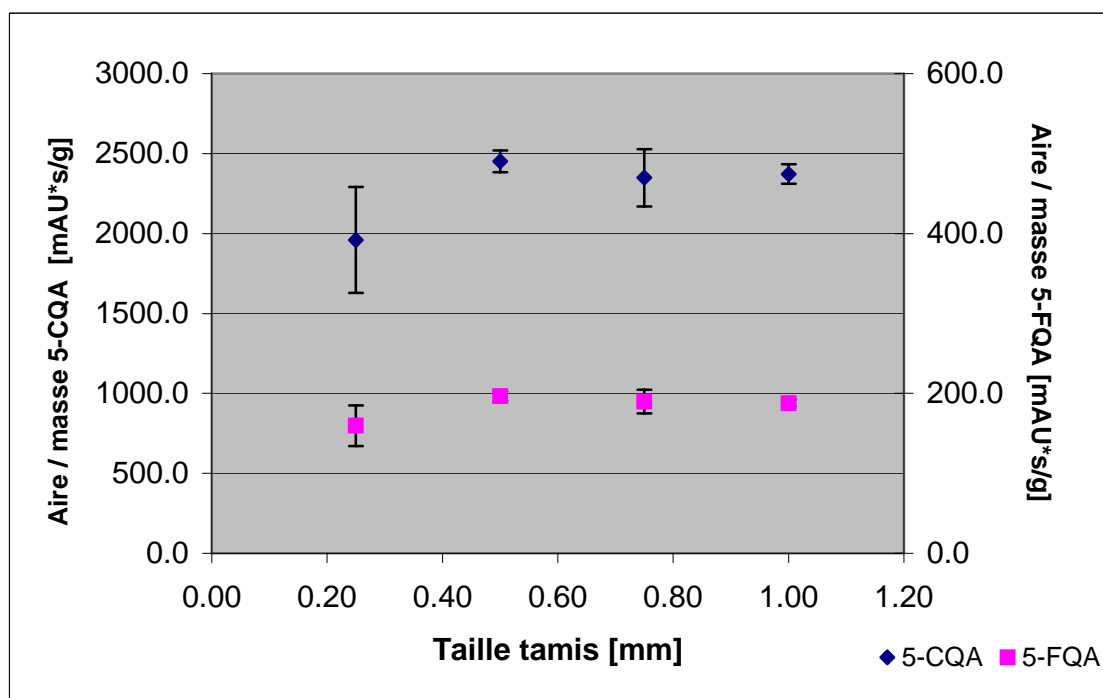
L'optimisation de la taille de la mouture revêt une certaine importance étant donné que la paroi entourant le grain constitue une barrière importante à la diffusion des composés mis à l'épreuve tels la caféine et les acides chlorogéniques [22]. On broie donc le végétal pour augmenter la perméabilité des tissus et des cellules.

Concernant ce type d'analyse, la teneur optimale en éthanol ainsi que les températures optimales ont été appliquées à toutes les extractions. Les observations suivantes ont pu être notées pour les cafés verts de type Robusta (graphique 5) et de type Arabica (graphique 6).



Graphique 5: Robusta: Détermination de la taille de la mouture optimale

Les résultats détaillés (aires des pics, masses, moyennes, écart-types...) peuvent être consultés à l'annexe 13.



Graphique 6: Arabica: Détermination de la taille de la mouture optimale

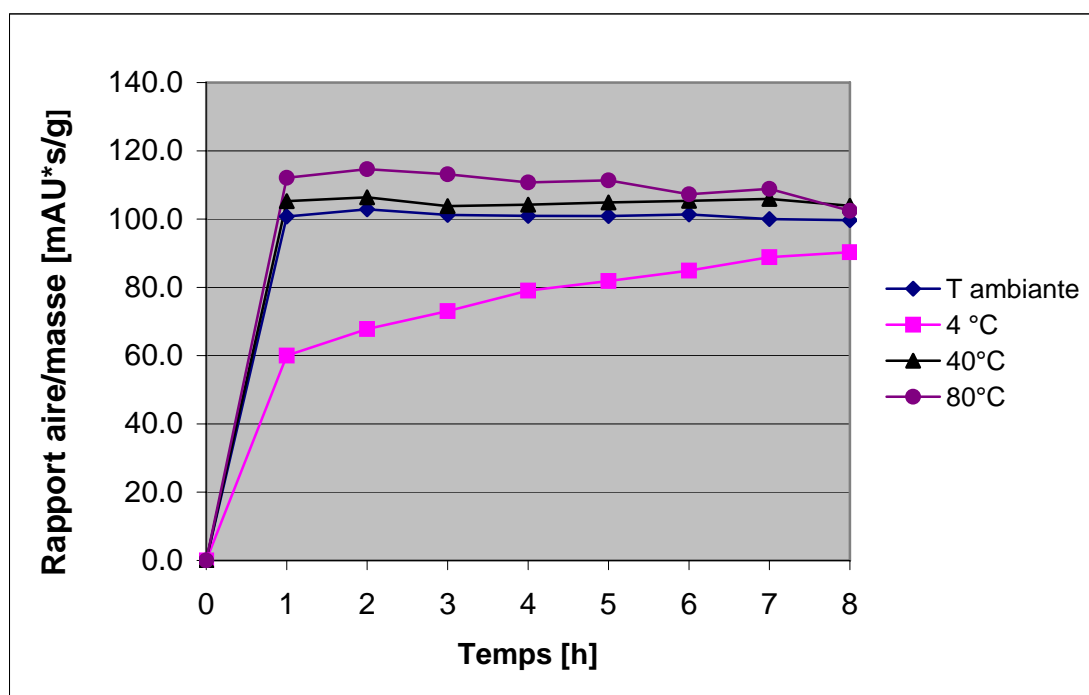
Les résultats détaillés (aires des pics, masses, moyennes, écart-types...) peuvent être consultés à l'annexe 13.

Dans les cas précédemment observés, on remarque une tendance identique à savoir qu'aucune différence majeure n'intervient entre les diverses tailles de particules utilisées en ce qui concerne l'extraction des acides caféyl et féruloyl-quiniques. Le Manuel Suisse des Denrées Alimentaires recommande toutefois une taille de particules inférieure à 0.63 mm lors de l'extraction des composés polyphénoliques et de la caféine [23]. Beaucoup d'autres publications ne précisent même pas la taille de particules utilisée.

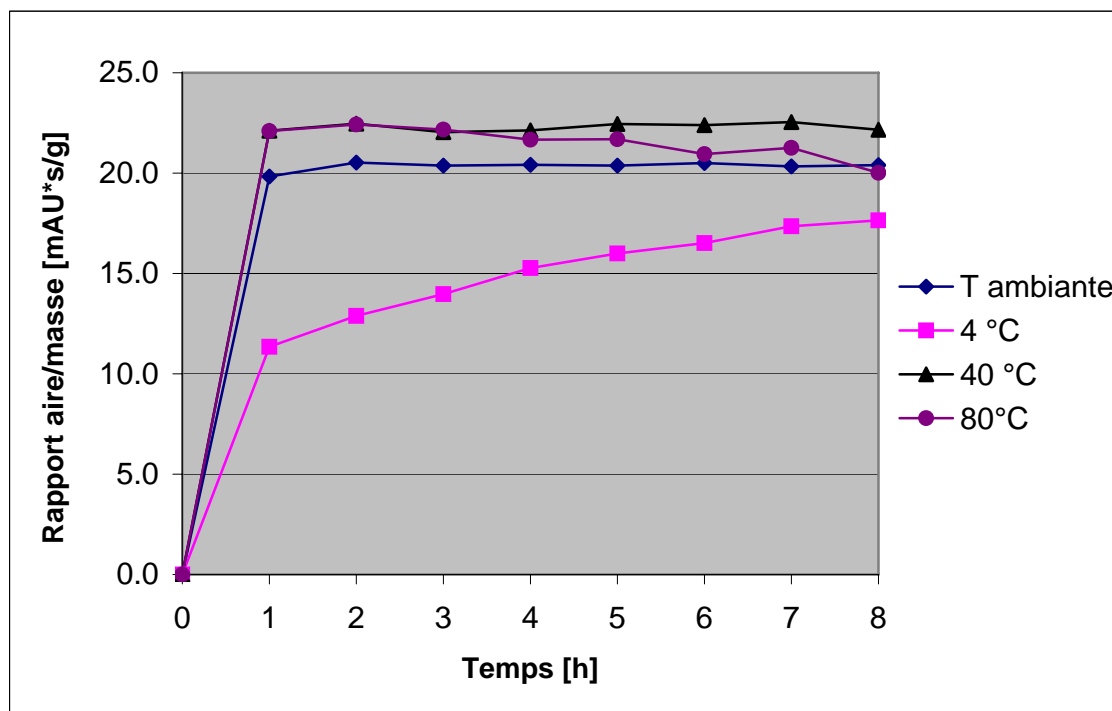
En fin de compte, suite à toutes ces optimisations, notons que les deux types de café réagissent tous deux pratiquement de la même manière face aux paramètres appliqués.

5.4 Optimisation de l'extraction par macération agitée

En tenant compte des optima déterminés pour l'ASE, quelques extractions ont été effectuées en utilisant la méthode de la macération agitée dans le but de se rapprocher d'un procédé plus communément utilisé en industrie que celui de l'extraction par solvant accéléré. Ainsi, les manipulations se sont effectuées dans le RC 1 avec une masse de départ de grains moulus de plus au moins exactement 100 g et avec un rapport drogue/solvant de 1:10. Les essais ont été suivis pendant 8 heures ce qui a permis d'établir pour chacun une cinétique d'extraction bien particulière. Les substances servant à la comparaison sont identiques à celles utilisées lors de l'optimisation présentée au point précédent. Des températures autres ont alors pu être testées telles celles de 4 et 25 °C ce qui n'était pas possible avec l'appareil Dionex (ASE) car ce dernier était incapable de fournir une température constante en dessous de 40 °C. Comme les tendances sont très similaires d'un café à l'autre, seul l'exemple du Robusta a été illustré (Graphiques 7 et 8) (Annexe 14). Les résultats concernant l'Arabica sont présentés en annexe 15.



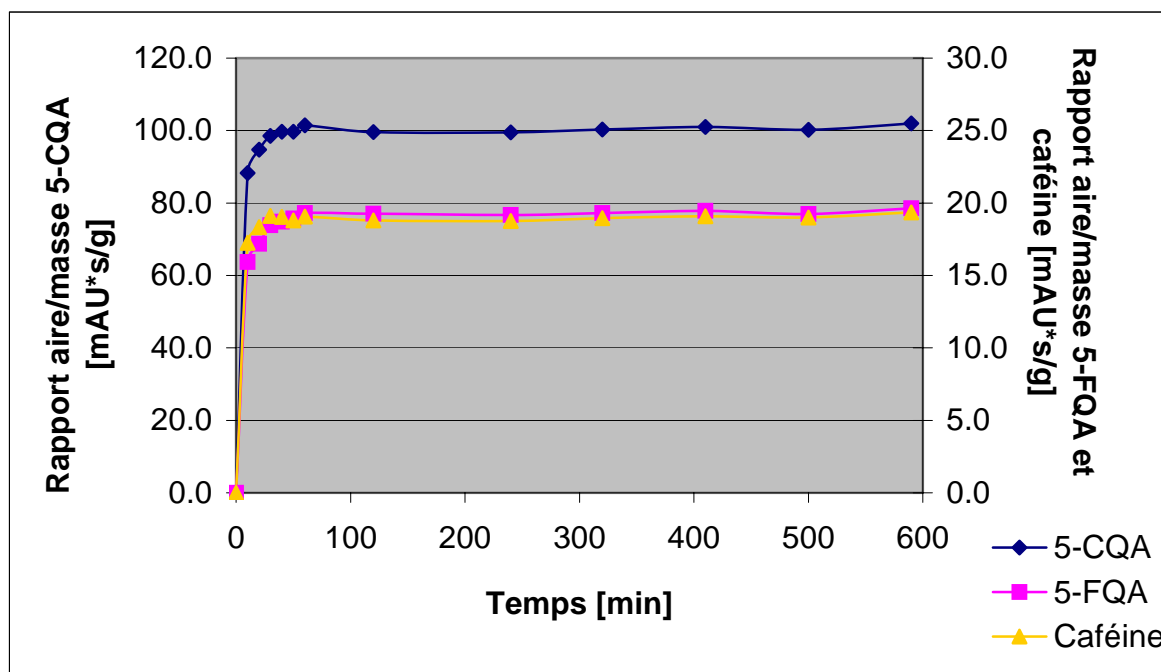
Graphique 7: Robusta: Cinétique de l'extraction de 5-CQA à différentes températures



Graphique 8: Robusta: Cinétique d'extraction de 5-FQA à différentes températures

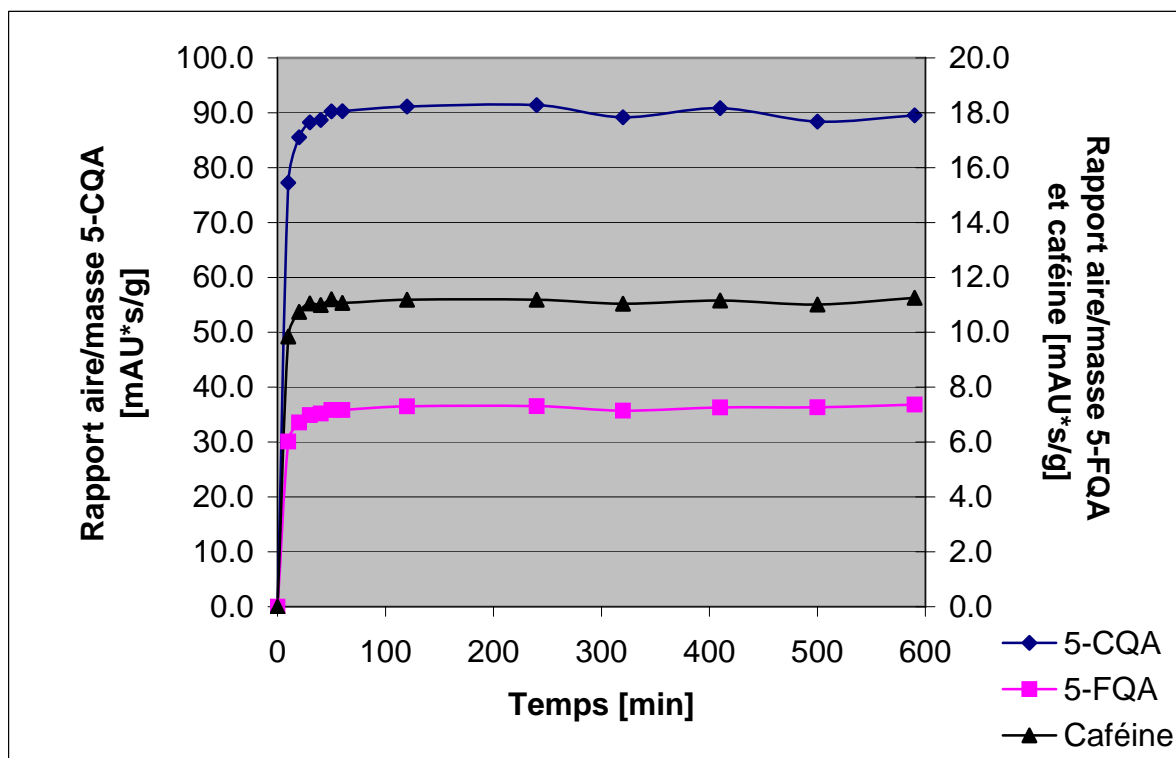
Etonnement, la majorité des composés sont extraits après une heure lorsque la température est supérieure à 4 °C. A cette température, la pénétration du solvant dans la matrice est beaucoup moins favorable qu'à température élevée. En effet, une augmentation de la température favorise un accroissement de la solubilité. Donc la solubilité de l'eau dans les solvants organiques augmente aussi ce qui implique une meilleure imprégnation de la matrice pour l'extraction. De plus, le travail à températures plus élevées diminue la viscosité, augmente le coefficient de diffusion et affaiblit les interactions entre les analytes et la matrice, c'est-à-dire que l'analyte passe plus rapidement en solution. Par conséquent la vitesse d'extraction en est aussi augmentée. Notons qu'à température élevée, 80 °C, une dégradation des composés polyphénoliques débute après environ 5 heures. Voilà une des raisons qui appuie la recommandation selon laquelle il ne faut pas dépasser une température d'extraction de 40 °C lorsque le travail est effectué avec une matrice végétale. Les paramètres déterminés par ASE ne se révèlent alors pas optimaux lors de la macération agitée ceci du fait que l'on n'est plus sous pression et que le temps d'extraction est beaucoup plus long qu'en ASE.

La température de 40 °C a alors été retenue pour effectuer un essai avec une taille de mouture plus grossière que celle d'1 mm et une quantification de la caféine. Donc, vu qu'il est surprenant que tout soit majoritairement extrait en une heure, plusieurs prélèvements ont été réalisés pendant la première heure à savoir toutes les dix minutes depuis l'introduction du café moulu dans le réacteur. Les autres prélèvements se sont espacés d'une heure jusqu'à une durée de 8 heures comme il a été coutume de le faire. Trois composés ont été dosés: les acides caféyl- et féruloyl-quiniques ainsi que la caféine. Il faut relever ici à nouveau l'existence de deux axes dans les graphiques 9 et 10. Celui de gauche réservé uniquement au 5-CQA tandis que celui de droite est en relation avec les teneurs en 5-FQA et en caféine qui sont dans ce cas similaires.



Graphique 9: Robusta: Cinétique d'extraction de 5-CQA, 5-FQA et de la caféine à 40 °C, 1mm

Les résultats détaillés (aires des pics, masses, moyennes, écart-types...) peuvent être consultés en annexe 14.



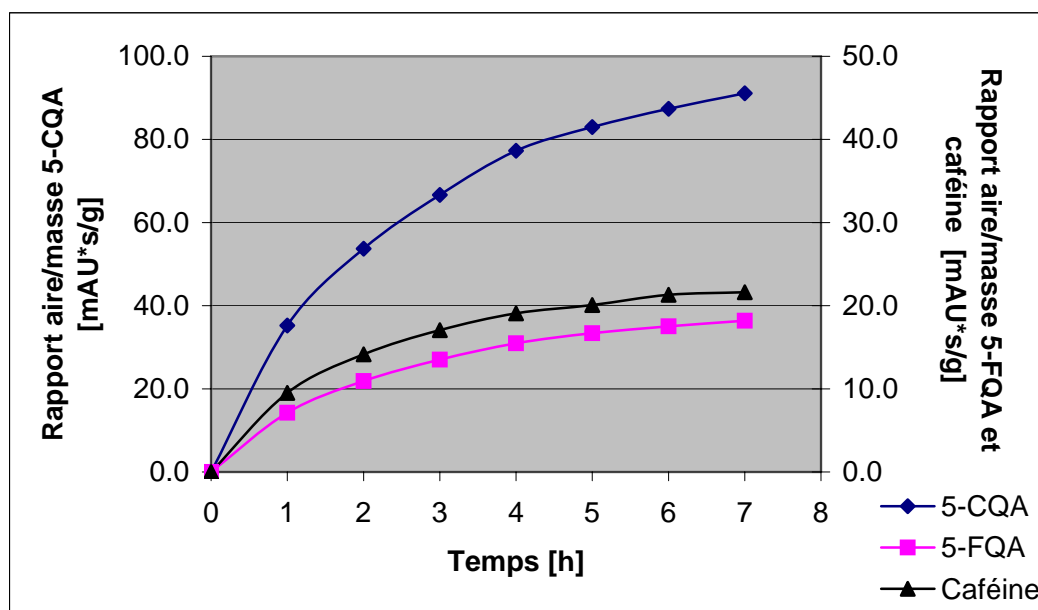
Graphique 10: Arabica: Cinétique d'extraction de 5-CQA, 5-FQA et de la caféine à 40 °C, 1 mm

Les résultats détaillés (aires des pics, masses, moyennes, écart-types...) peuvent être consultés à l'annexe 15.

Suite à ces deux illustrations, on remarque que l'extraction des composés polyphénoliques et de la caféine est très rapide car elle atteint presque son maximum après 30 min (troisième point sur le haut de la courbe). Le solvant et les conditions utilisés correspondent alors bien aux substances et à la matrice végétale en question [L].

D'autre part, notons que les concentrations en 5-CQA, 5-FQA et caféine sont plus élevées dans le Robusta que dans l'Arabica, différence qui était peu visible lors des extractions par solvant accéléré. De plus, les teneurs en caféine et en 5-FQA sont quasi similaires dans le Robusta ce qui n'est pas le cas dans l'Arabica où la caféine est présente en plus grande quantité que le 5-FQA. En outre, le Robusta contient approximativement le double de 5-FQA et de caféine par rapport à l'Arabica.

Un essai avec une mouture plus grossière (grains de café vert Robusta cassés avec un marteau) a été réalisé dans le but de déterminer le pourcentage de différence qu'il y aurait à l'égard des essais effectués avec une mouture de 1 mm. La cinétique de macération est illustrée dans le graphique 11 ci-dessous.



Graphique 11: Robusta: Cinétique d'extraction de 5-CQA, 5-FQA et de la caféine à 40 °C, morceaux

Les résultats détaillés (aires des pics, masses, moyennes, écart-types...) peuvent être consultés à l'annexe 16.

Le profil de l'extraction est très similaire à celui obtenu lors de l'essai à 4 °C. Il est inutile de préciser que cette alternative a été rapidement abandonnée étant donné qu'après une heure, on se situe pour les composés polyphénoliques et la caféine à respectivement 33 et 49 % d'une extraction effectuée avec une mouture de 1 mm. La parche revêt ici alors toute son importance dans la diffusion des composés.

Rappelons que l'extraction en elle-même ne pose pas de problèmes mais la séparation des différentes phases est très délicate vu la grande quantité de lipides présente. Une des solutions

à petite échelle est la centrifugation comme utilisée lors des prélèvements du surnageant. Lors de ces macérations, il aurait été intéressant de travailler en atmosphère inerte pour déterminer le rôle de l'oxygène sur l'extraction.

5.5 Détermination de la matière sèche

La teneur en matière sèche (dry matter, DM) des extraits de café vert a été déterminée sur des échantillons provenant d'extractions par solvant accéléré. Les moyennes ainsi que les écart-types de trois essais figurent dans le tableau 9 (Annexe 17).

Tableau 9: Moyennes et écart-types des teneurs en matière sèche des extraits de café vert Robusta et Arabica

Matière sèche	Robusta	Arabica
Moyenne [%]	2.3	2.6
Ecart-type [%]	0.2	0.2

Connaissant ainsi la masse de café vert introduite dans la cellule et celle de l'extrait liquide obtenu à la fin de l'extraction, il est possible de rapporter la teneur en matière sèche aux grains de café (tableau 10) (Annexe 17).

Tableau 10: Moyennes et écart-types des teneurs en matière sèche des grains de café vert Robusta et Arabica

Matière sèche	Robusta	Arabica
Moyenne [%]	14.5	17.0
Ecart-type [%]	0.9	1.0

Par conséquent, pour 100 g de café vert, on obtient pour le Robusta et l'Arabica respectivement 15 et 17 g de matière sèche dans laquelle se trouvent les composés polyphénoliques recherchés ainsi que la caféine. Selon les tableaux précédents, les résultats sont du même ordre de grandeur pour les deux types de café que cela soit au niveau des moyennes qu'à celui des écart-types. Notons toutefois une teneur en matière sèche un peu plus élevée, de l'ordre de 2 %, pour l'Arabica.

5.6 Détermination qualitative des composés polyphénoliques et de la caféine

En règle générale, la méthode de choix pour l'analyse des acides-phénols d'un végétal est la chromatographie liquide à haute pression. Elle est mise en œuvre sur des phases inverses (par ex: C₁₈), éluées avec des mélanges d'eau, d'alcools et d'acides. [5]

La méthode d'élution et de détection est restée, dans un premier temps, la même que celle développée pendant le travail de semestre [15] (point 4.3.7) car elle permet de déterminer le 5-CQA et le 5-FQA, ce qui était nécessaire pour pouvoir effectuer de manière concise l'optimisation des extractions. Ensuite, la séparation a été améliorée de manière à pouvoir

distinguer clairement les différents isomères, ce qui était déjà en partie possible avec l'ancienne méthode.

Tout d'abord, un test de la colonne a été effectué en injectant un échantillon datant du travail de semestre afin de vérifier si le pouvoir de séparation de cette dernière n'avait pas diminué. Le chromatogramme résultant montre que les substances présentes dans la solution sont bien séparées et que la colonne peut être considérée comme étant toujours en bon état.

Un travail plus approfondi a été entrepris sur les échantillons des macérations agitées à 40 °C qui ont été analysés une fois avec une ionisation APCI à polarité en mode positif et une fois à polarité en mode négatif (Annexe 18) dans le but de déterminer quel type de substances constitue les extraits de café vert. Ainsi, tous les composés polyphénoliques sont visibles en mode négatif. Il sont plus difficilement détectables en mode positif car ceci dépend de leur concentrations, en effet, seuls le 5-CQA et le 5-FQA peuvent être discernables sur le chromatogramme MS à cause de leurs concentrations plus élevées. Grâce à l'ionisation en mode positif, le pic correspondant à la caféine apparaît entre celui du 5-CQA et du 5-FQA. Notons qu'il s'agit ici d'une ionisation douce avec laquelle on évite la fragmentation des molécules ce qui permet d'analyser des substances à grand poids moléculaire. L'ionisation chimique à pression ambiante consiste en une ionisation chimique dans la phase gazeuse où le solvant fait office de réactif d'ionisation.

Lors de la mise en place des séquences, des blancs composés d'un mélange MeOH/H₂O 50:50 ont été introduits avant et après l'analyse des échantillons, ces derniers ont montré qu'il n'y avait pas d'effet de mémoire car, mis à part le pic d'injection, aucune autre substance n'a été détectée par UV et par MS, c'est-à-dire qu'aucun pic n'est apparu.

Rappelons qu'en UV deux types de longueur d'ondes sont utilisés, celle à 325 nm pour détecter les composés polyphénoliques et celle à 254 nm nécessaire pour doser la caféine. Les acides-phénols sont aussi visibles à cette longueur d'onde mais cette dernière en donne un signal plus faible qu'à 325 nm. Dans certaines publications, les longueurs d'onde de 315 et 316 nm sont aussi proposées. Elles ont été testées sur l'HPLC-DAD lors d'une analyse simultanée à 254 et 325 nm. Il en est ressorti que le signal maximal était obtenu avec 325 nm bien qu'il y ait peu de différence avec celui fourni à 316 nm (Annexe 19).

Ainsi, selon la publication [24], l'ordre d'élution à 325 nm est le suivant: 3-CQA; 4-CQA; 5-CQA; 5-FQA; 3,4-diCQA; 3,5-diCQA et 4,5-diCQA. Malgré le fait que la méthode d'analyse ne soit pas tout à fait pareille à celle proposée par la publication, l'ordre d'élution en reste néanmoins identique. Seul bémol, avec la méthode analytique développée, il n'est pas encore possible de déterminer précisément le 4,5-diCQA vu qu'il est représenté par un double pic.

Pour la détermination des isomères, la méthode d'élution a été améliorée et les remarques qui suivent vont se baser sur des chromatogrammes obtenus selon cette méthode déjà citée au point 4.3.7.

Par conséquent, le chromatogramme UV effectué à 325 nm présente 11 pics dont 6 sont intéressants et le chromatogramme MS en illustre 10 dont 6 concernant les composés polyphénoliques. Lorsque l'on effectue l'analyse à 254 nm et en mode positif, un pic s'ajoute aux deux énumérations, il s'agit de la caféine (Annexe 18). Rappelons que les fragmentations

sont de type α , c'est-à-dire que les liaisons en position α par rapport à un hétéroatome sont préférentiellement scindées, la charge étant mieux stabilisée par ce dernier. Le clivage se fait couramment du côté le plus lourd.

Les tableaux 11 et 12 proposent une récapitulation des fragments obtenus par le détecteur MS en mode négatif et positif dans le cadre d'une analyse d'un extrait sec d'Arabica (Annexe 18). Les fragments attendus sont écrits en gras.

Tableau 11: Temps de rétention, pic moléculaire et fragmentations détectées en mode négatif, 325 nm

t_r [min]	MS [M-1]⁻	Autres pics dont fragments de MS [M-1]⁻
9.7	353	191 , 354
13.9	367	193, 368, 369
14.4	353	173, 354
15.2	353	191 , 192, 354 707
18.2	367	173, 193, 368
19.6	367	191 , 368
24.5	515	135 , 193, 516
25.8	515	135 , 191 , 193, 353 , 516, 517

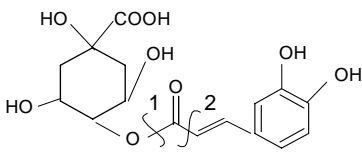
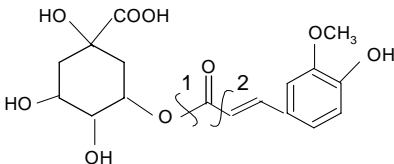
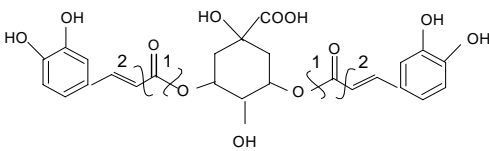
Tableau 12: Temps de rétention, pic moléculaire et fragmentations détectées en mode positif, 254 nm

t_r [min]	MS [M+1]⁺	Autres pics dont fragments de MS [M+1]⁺
9.7	355	163 , 164
14.5	355	163 , 164
15.3	355	163 , 164
16.5	195	138 , 196
19.7	369	177 , 178, 195
24.6	517	163 , 177, 194, 195, 337, 499, 500
25.9	517	163 , 195, 355 , 499, 500

Les pics qui apparaissent après un temps de rétention de 26 min n'ont pas été considérés car il s'avère que ces derniers représentent une multitude de composés qui sont probablement des dimères de l'acide caféyl-quinique et de l'acide féruloyl-quinique. Des améliorations sont encore à effectuer dans cette partie du chromatogramme vu que certains pics semblent être doubles. De plus, le premier pic sortant à environ 2 min n'est rien d'autre que le pic d'injection dont il ne faut pas tenir compte lors de l'interprétation même si le programme informatique de l'HPLC-UV-MS décrit ce pic comme étant celui d'un composé pur. En outre, les petits pics apparaissant à 13.9 et 18.2 min sont en fait respectivement le 3- et le 4-FQA [24]. Comme ces derniers ne sont pas bien distinguables en mode positif et qu'ils n'apparaissent que dans certains chromatogrammes représentant des échantillons assez concentrés, ces deux substances n'ont pas été quantifiées. Suite à ces analyses en mode négatif et positif, à 325 et 254 nm, aucune autre substance pouvant être contenue dans le café vert n'a été décelée. Notons que la recherche s'est principalement axée sur la trigonelline, une base azotée présente à raison de 0.4-1.2 % dans les grains de café vert. Cette dernière n'a alors pas été détectée.

Pour faciliter l'interprétation, le tableau suivant illustre les molécules principales dont la conformation est sans ambiguïté, leur masse molaire ainsi que les fragmentations possibles.

Tableau 13: Nom, masse molaire et masses des fragments de certaines molécules analysées

Représentation de la molécule	Nom	M [g/mol]	Fragmentation 1		Fragmentation 2	
			G ¹⁾	D ²⁾	G	D
	4-CQA	354	191	163	219	135
	5-FQA	368	191	177	219	149
	3, 5 diCQA	516	381	135	353	163

1) masse du fragment se trouvant à gauche de la coupure

2) masse du fragment se trouvant à droite de la coupure

Les mécanismes de fragmentation sont aussi valables pour les molécules de même masse moléculaire. Par exemple, les fragmentations de 4-CQA sont aussi celles de 3-CQA et de 5-CQA.

En ce qui concerne l'interprétation des spectres MS, les explications se fonderont sur les molécules représentées dans le tableau 13 tout en sachant qu'elles sont aussi valables pour leurs isomères respectifs comme cité précédemment.

Tout d'abord, le pic possédant un temps de rétention de 9.7 min affiche, en ionisation en mode négatif, un pic moléculaire à m/z de 353 et un pic de base de 191 m/z . Ce dernier résulte de la fragmentation 1 G (pour abréviations voir tableau 13) qui est caractéristique des acides caféyl-quiniques. Notons la présence, lors de l'ionisation en mode positif, d'un fragment à 163 m/z dont la formation est expliquée à la figure 8. Ce premier pic correspond alors au 3-CQA [24]. La raison pour laquelle il ne s'agit pas du 4-CQA est que dans la forme chaise de l'acide chlorogénique, lorsque les substitutions se font en position 4 et 5, les substituants prennent la position axiale tandis que lorsque la substitution se fait en position 3, le fragment occupe la position équatoriale. Les pics des 4- et 5-CQA sont très proches l'un de l'autre car leurs interactions avec une phase stationnaire sont très similaires.

La même réflexion peut être faite lors de l'analyse approfondie du pic suivant ($t_r = 13.9$), le spectre est celui du 3-FQA vu la présence du pic moléculaire à 367 m/z .

Le signal apparaissant à un temps de rétention de 14.5 min est celui du 4-CQA malgré le fait que le fragment attendu de 191 m/z n'est pas clairement visible. Cependant un fragment d'un rapport m/z de 173 est détecté. Celui-ci peut s'expliquer par la fragmentation suivante illustrée à la figure 7:

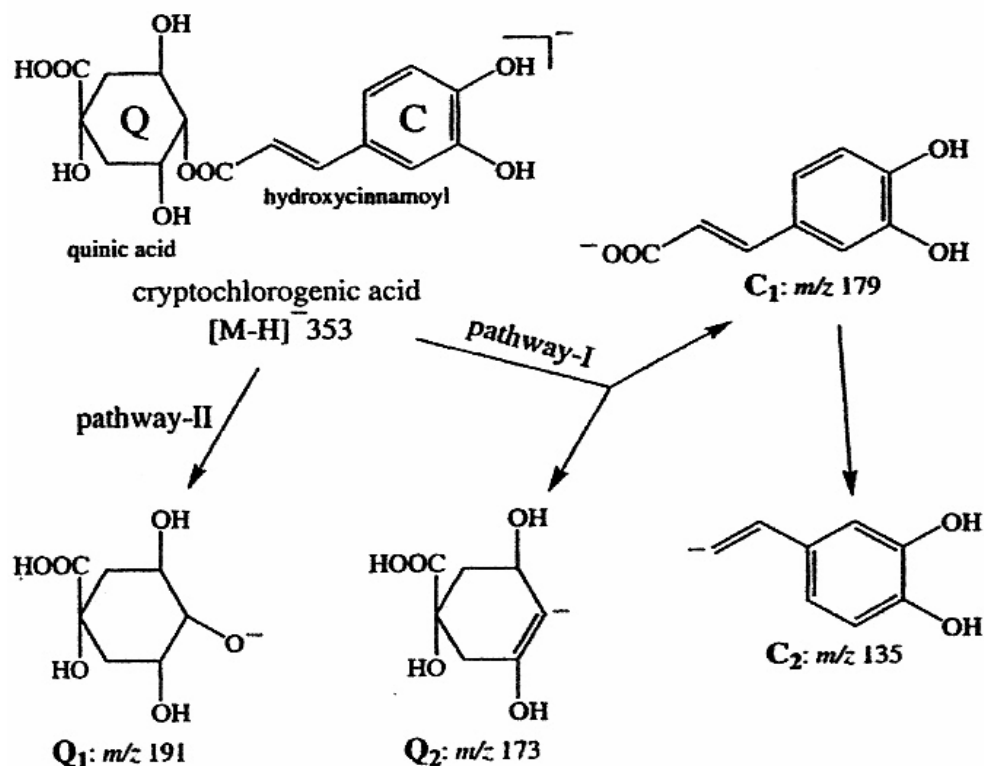


Figure 7: Mécanismes de fragmentation du 4-CQA en mode négatif [25]

Il est alors aussi possible d'expliquer le mécanisme de fragmentation lors d'une ionisation en mode positif. On retrouve ainsi le fragment attendu de 163 m/z présenté à la figure 8.

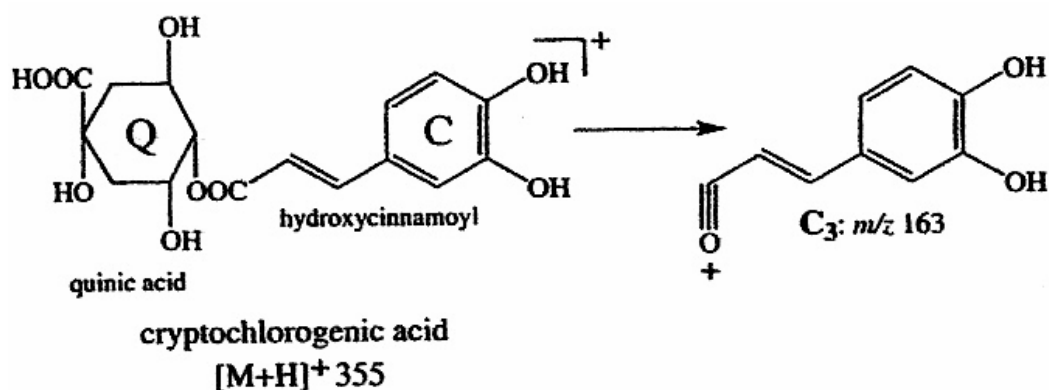
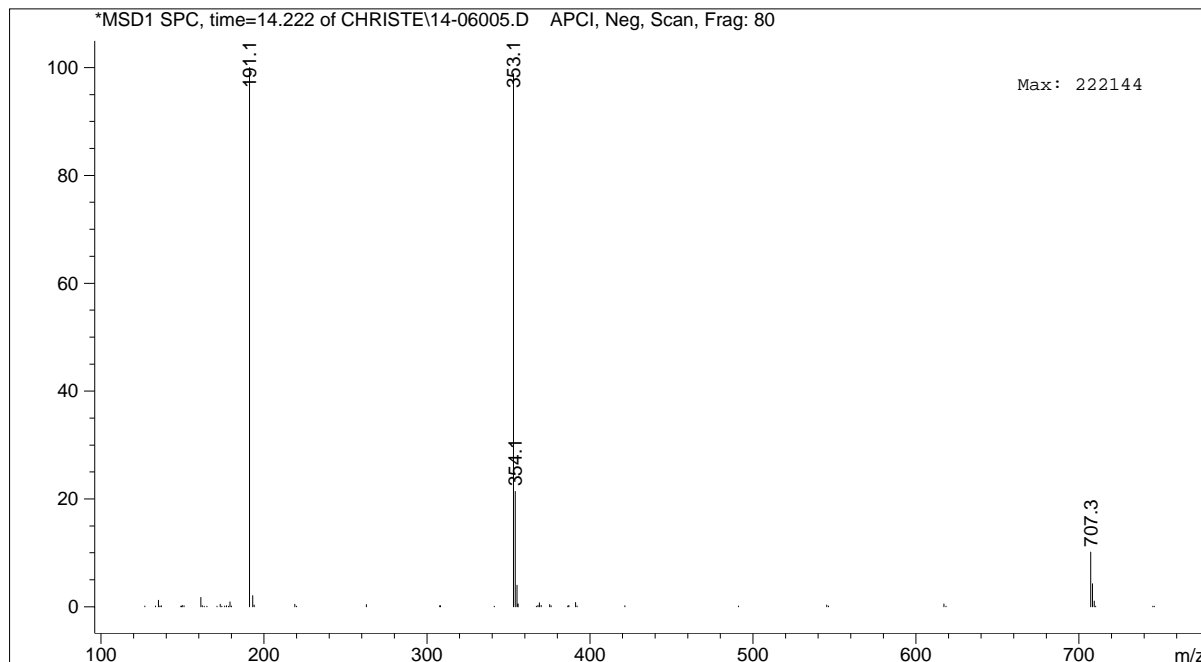


Figure 8: Mécanismes de fragmentation du 4-CQA en mode positif [25]

En outre, le spectre suivant représentant le pic ($t_r = 15.3$) semblerait être celui d'un composé pur.



Spectre 1: Fragmentation de 5-CQA

De ce fait, comme démontré ci-dessus, la présence de 5-CQA est déterminée par le pic moléculaire à m/z 353 ainsi que par son fragment caractéristique de 191 (fragmentation 1 G). Le pic à m/z valant 707 représente en fait $[2M-H]^-$. Il aurait pu s'agir d'une estérification de ces deux molécules mais dans ce cas la masse serait de $(2 \times 354) - 18 = 690$ à cause de la perte d'eau lors de la réaction. Notons que le fragment à m/z de 163 en ionisation en mode positif est aussi retrouvé.

Lors de l'observation du spectre MS représentant le pic possédant un temps de rétention de 18.2 min, il est constaté qu'il s'agit d'une fragmentation similaire à celle proposée pour le 4-CQA (figure 7) puisque un fragment à m/z de 173 est retrouvé. Ce dernier semblerait alors être caractéristique des composés polyphénoliques substitués en position 4. Il s'agit donc du 4-FQA [24] vu que la partie acide quinique est commune aux deux molécules (figure 5).

Puis, le pic apparaissant à un temps de rétention de 19.6 min est l'image lui aussi d'un composé pur. Il s'agit du 5-FQA [8] [24] qui est représenté, en ionisation en mode négatif, par son pic moléculaire à $[M-H]^- = 367$ et par un fragment caractéristique à 191 (fragmentation 1 G) et en ionisation en mode positif par un fragment de m/z à 177.

Ensuite, il est possible de déceler la présence du 3,4-diCQA [24] possédant un temps de rétention de 24.5 min. Ce pic présente le fragment caractéristique en mode négatif de m/z 135 (fragmentation 1 D) (figure 7) et en mode positif de m/z 163 (figure 8) ainsi que d'autres types de fragments n'étant pas attendus en ionisation douce.

Il en est de même pour le 3,5-diCQA ($t_r = 25.8$) [24] qui possède un pic moléculaire à 515 et qui fournit les mêmes fragments cités ci-dessus en plus de ceux à 191 et 353 m/z .

(fragmentation 2 G) pour une ionisation négative et celui de 355 m/z en mode positif. Toutefois, d'autres fragments sont présents et ne permettent pas d'affirmer que ces deux derniers pics soient ceux de composés parfaitement purs.

Le seul pic qui ne se détecte qu'à 254 nm et uniquement en mode positif est celui de la caféine possédant un temps de rétention de 16.5 min. Cet alcaloïde possède un fragment caractéristique à un m/z de 198 ainsi qu'un pic moléculaire à 195. La substance pure présente elle aussi ces deux types de fragments.

Le dernier isomère qu'il manque à cette énumération est le 4,5-diCQA qui se situe probablement à un temps de rétention de 28 min mais le pic présent est double. Il faudrait encore traiter cette partie du chromatogramme dans le but de déterminer les substances qui s'y trouvent. Notons qu'il est alors aussi tout à fait possible de détecter l'acide diféruloyl-quinique ainsi que ses isomères respectifs.

De plus, il serait envisageable de séparer les dimères des acides dicaféyl- et diféruloyl-quiniques en ajoutant à la phase mobile du cyclodextrine qui va jouer un rôle de compétiteur d'interactions hydrophobes. Cette molécule peut former des complexes selon son affinité avec les réactifs par interactions avec la cavité du cyclodextrine. Ces complexes sont décrits par une constante de complexation qui dépend de la structure de la molécule. Comme ces constantes ne sont pas les mêmes pour les isomères, une séparation des différents produits est alors possible [26]. Une autre alternative serait d'utiliser une colonne préparative [8].

5.7 Détermination quantitative des composés polyphénoliques et de la caféine

La quantification de toutes les substances s'est réalisée à l'aide de deux calibrations, une avec un standard d'acide chlorogénique, isomère 5-CQA, et l'autre avec un standard de caféine (Annexe 8). Les données concernant la pureté de ces deux produits ainsi que leur provenance se situent dans le tableau 1 traitant du type de réactifs utilisés et de leurs toxicités respectives.

Ainsi, les isomères 3- et 4-CQA ont été quantifiés à l'aide du standard 5-CQA sans utiliser de facteur de conversion. Dans le but d'effectuer une quantification directe, il serait intéressant de synthétiser les différents isomères puisque les méthodes existent et ont déjà été testées. La seule difficulté consisterait en l'obtention d'un produit pur car ces composés s'isomérisent facilement. Les 3 et 4-FQA n'ont pas été dosés étant donné qu'ils n'apparaissent pas distinctement dans tous les chromatogrammes vu que leur signal dépend du gradient d'élution utilisé ainsi que de leur concentration dans l'extrait. Le 5-FQA a aussi été dosé à l'aide du 5-CQA mais un facteur de conversion a été établi, il s'agit du rapport de la masse molaire de la substance sur celle du standard, ce qui donne un facteur de multiplication de 1.040. Comme il s'agit du même chromophore, il n'est pas nécessaire de corriger le coefficient d'absorption, ce qui n'est pas le cas lorsque l'on quantifie les acides dicaféyl-quiniques. En effet, comme il y a deux chromophores, cela absorbe deux fois moins. La correction du coefficient serait approximativement de 0.5 mais comme on possède les coefficients d'absorption des deux molécules, en faisant le rapport du coefficient d'absorption molaire de la substance sur celui du standard, on obtient une valeur de 0.614. Le facteur de conversion se calcule à nouveau comme cité précédemment sauf qu'il faut multiplier le rapport des masses molaires par le facteur de correction du coefficient ce qui donne enfin un facteur de conversion de 0.895. Il

est inutile de préciser que la caféine a fait l'objet d'une quantification directe. Afin que les explications soient plus claires, un exemple de calcul est présenté en annexe 20.

Les limites de détection ont été calculées à partir des standards respectifs à l'aide de la formule $S/N = 3$ (rapport signal sur bruit vaut 3) et sont pour la caféine et l'acide chlorogénique respectivement de 1.04 mg/l et de 0.04 mg/l.

5.8 Epuisement

Lors des épuisements effectués par ASE, trois essais ont été réalisés pour chaque type de café. Les diminutions des teneurs en caféine, 3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 5-FQA, 3,4-diCQA et 3,5-diCQA ont été considérées lors des triples passages successifs du solvant dans la cellule d'extraction afin de déterminer l'épuisement total de la plante. Ainsi, les taux de recouvrement des extractions ont été déterminés et ces derniers sont illustrés dans les tableaux 14 et 15.

Tableau 14: Taux de recouvrement des extractions effectuées pour Robusta (Annexe 21)

Composé	Taux de recouvrement [%]	
	Après une extraction	Après trois extractions
Caféine	63.6	94.6
3-CQA	63.5	94.8
4-CQA	61.3	93.3
5-CQA	58.0	91.7
5-FQA	63.0	94.2
3,4-diCQA	56.9	90.7
3,5-diCQA	56.4	90.4

Tableau 15: Taux de recouvrement des extractions effectuées pour Arabica (Annexe 22)

Composé	Taux de recouvrement [%]	
	Après une extraction	Après trois extractions
Caféine	69.6	97.1
3-CQA	66.3	95.7
4-CQA	65.3	95.2
5-CQA	64.8	95.0
5-FQA	69.5	96.4
3,4-diCQA	65.3	94.9
3,5-diCQA	65.6	95.3

Cette technique permet de déterminer l'affinité des composants recherchés pour le solvant d'extraction. Notons alors que les substances contenues dans les grains de café vert Arabica semblent être extraites plus rapidement que celles se trouvant dans le Robusta. Les teneurs élevées en lipides des grains de café rendent difficile l'extraction vu qu'il arrive parfois que cette graisse obstrue les conduites de l'appareil et empêche l'extrait liquide d'atteindre le vial.

5.9 Détermination de la teneur en principes actifs de la plante sèche

Cette quantification a été effectuée avec des échantillons résultant d'une extraction par solvant accéléré plus particulièrement lors de l'épuisement présenté au point précédent. La teneur en substances de la plante sèche (PS) a été déterminée en considérant un épuisement total de la plante (Annexe 21 et 22). Les résultats sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16: Teneur en % plante sèche de la caféine et des composés polyphénoliques pour Robusta et Arabica avec une ASE

Composé	Teneur [% PS]	
	Robusta	Arabica
Caféine	2.2	1.5
3-CQA	0.4	0.5
4-CQA	0.6	0.7
5-CQA	4.7	5.1
5-FQA	0.9	0.4
3,4-diCQA	0.5	0.2
3,5-diCQA	0.6	0.4
Somme polyphénols	7.7	7.3

Le peu de différence qu'il existe entre les deux types de café lorsque l'on effectue une extraction par solvant accéléré est à noter. Le plus grand écart se situe pour la caféine avec une différence de 0.7 % PS. Une comparaison de ces teneurs peut être réalisée avec des échantillons provenant d'une macération agitée puisqu'une extraction par solvant accéléré correspond en fait à une macération agitée de 12 heures. Les résultats d'une extraction par macération agitée effectuée à 40 °C (Annexe 23) sont présentés dans le tableau suivant:

Tableau 17: Teneur en % plante sèche de la caféine et des composés polyphénoliques pour Robusta et Arabica avec une macération agitée

Composé	Teneur [% PS]	
	Robusta	Arabica
Caféine	2.5	1.5
3-CQA	0.6	0.5
4-CQA	0.7	0.7
5-CQA	5.4	4.7
5-FQA	1.2	0.4
3,4-diCQA	0.6	0.3
3,5-diCQA	0.8	0.4
Somme polyphénols	9.3	7.0

Ainsi, peu de divergences subsistent entre les résultats obtenus par les deux méthodes sauf pour le 5-CQA qui est présent en plus grande quantité dans le Robusta lors de la macération agitée. Pour chaque macération effectuée, que cela soit à 4, 25, 40 ou 80 °C et quelle que soit la substance considérée, le Robusta possède toujours les teneurs les plus élevées (Annexe 23). C'est pourquoi il a été décidé d'effectuer le process avec ce type de café vert. Notons que la macération agitée semble être plus favorable à l'extraction des composés polyphénoliques dans le Robusta que dans l'Arabica. La somme des composés polyphénoliques est en vérité plus élevée que celle inscrite dans le tableau précédent étant donné qu'il y a encore le 3- et 4-FQA ainsi que le 4,5-diCQA qui n'ont pas été quantifiés.

Les teneurs attendues en caféine sont de 0.8 à 1.5 % PS pour l'Arabica tandis que pour le Robusta, la teneur varie en moyenne entre 1.6 et 2.2 % PS, certains atteignent 2.8 % PS et dépassent même 3 % PS [2]. Les résultats obtenus de 2.5 % PS pour le Robusta et de 1.5 % PS pour l'Arabica concordent aisément avec les teneurs citées dans la littérature. En ce qui concerne les composés polyphénoliques, les quantités théoriques pour les acides dicaféyl-quiniques sont de 4.3-7.2 % PS [8]. Ainsi, les valeurs obtenues sont sommées pour les 3-, 4- et 5- CQA et des teneurs respectivement pour le Robusta et l'Arabica de 6.7 % PS et 5.9 % PS sont déterminées lors de la macération agitée et de 5.9 % PS et 6.3 % PS lors de l'extraction par solvant accéléré. Les acides féruloyl-quiniques constituent les grains de café à raison de 0.3-1.2 % PS [8]. Malgré le fait qu'un seul isomère a été quantifié, les teneurs obtenues entrent dans la fourchette attendue avec des concentrations allant de 0.4 à 1.2 % PS selon la méthode d'extraction utilisée et le type de café considéré. Enfin, la quantité d'acides dicaféyl-quiniques attendue est de 0.8-2.5 % PS [8]. Avec le même type de raisonnement, des concentrations allant de 0.6 à 1.4 % PS sont déterminées selon la méthode d'extraction utilisée et le type de café considéré.

5.10 Détermination de la teneur en principes actifs de la matière sèche

Afin de déterminer la teneur en principes actifs de la matière sèche, il faut pouvoir concentrer l'extrait liquide et obtenir finalement un extrait sec. C'est ce qui a été réalisé avec le surnageant d'une macération agitée effectuée à 40 °C (point 4.3.4). Un extrait sec a été obtenu alors qu'un extrait gluant était plutôt attendu vu la quantité de graisse que contient le café [M]. Les essais sont effectués sur les deux types de café ainsi que sur un échantillon commercial d'extrait de café vert (Annexe 6) et les résultats sont présentés dans le tableau 19.

Tableau 18: Teneur en % matière sèche des différents extraits de café vert

Composé	Teneur [% DM]		
	Robusta	Arabica	Echantillon commercial
Caféine	7.9	4.5	11.9
3-CQA	1.8	1.7	3.4
4-CQA	2.3	2.3	4.2
5-CQA	16.8	15.6	18.7
5-FQA	3.7	1.4	5.0
3,4-diCQA	2.0	0.8	2.8
3,5-diCQA	2.3	1.3	2.6
Somme polyphénols	29.8	23.1	38.5

Les composés sont alors présents en plus grande quantité dans l'échantillon commercial et le Robusta contient à nouveau plus de principes actifs que l'Arabica. Ainsi, les polyphénols représentent pour le Robusta, l'Arabica et l'échantillon commercial respectivement 30, 23, et 39 % de la matière sèche. Quant à la caféine, elle est contenue en plus grande quantité dans l'échantillon commercial d'extrait de café vert à raison de 12 % tandis que dans le Robusta et l'Arabica la quantité est beaucoup plus faible. Il serait intéressant de connaître le procédé utilisé, plus particulièrement la méthode d'extraction, pour l'obtention de cet échantillon commercial d'extrait de café de manière à pouvoir considérer plus sérieusement les teneurs citées au tableau 18. Rappelons que les teneurs totales en composés polyphénoliques représentent les valeurs minimales puisque certaines substances n'ont pas été quantifiées bien qu'elles aient été détectées.

5.11 Test de stabilité des composés polyphénoliques à 100 °C

L'importance de ce test est primordiale car l'utilisation finale de l'extrait de café vert dépend fortement des résultats obtenus. En effet, le but de ce développement est de réintroduire les composés polyphénoliques dans le café une fois torréfié [N] [O]. Si ces derniers ne résistent pas à l'eau bouillante utilisée pour préparer un café boisson, il faudrait trouver une autre application de ces extraits de café vert dans l'alimentaire ou la cosmétique par exemple. En fonction des tests effectués sur des extraits secs de Robusta, d'Arabica et d'un échantillon commercial (Annexe 7), il s'avère que la diminution des teneurs est effective pour certaines substances mais reste néanmoins minimale. Les composés sont dilués dans de l'eau milli-Q contrairement aux échantillons qui ont été mesurés précédemment et qui étaient dilués dans une solution de méthanol/eau 1:1. Les résultats sont présentés dans les tableaux 19, 20, et 21.

Tableau 19: Teneur en % matière sèche des extraits secs de Robusta avant et après le traitement thermique à 100 °C

Composé	Teneur [% DM]		Pertes [%]
	Avant	Après	
Caféine	7.6	4.6	39.4
3-CQA	1.7	1.7	1.5
4-CQA	2.3	2.2	0.8
5-CQA	15.4	14.6	5.3
5-FQA	3.2	1.2	62.2
3,4-diCQA	1.8	0.8	56.7
3,5-diCQA	2.0	1.2	41.8
Somme polyphénols	26.4	21.7	17.8

Tableau 20: Teneur en % matière sèche des extraits secs d'Arabica avant et après le traitement thermique à 100 °C

Composé	Teneur [% DM]		Pertes [%]
	Avant	Après	
Caféine	4.6	4.7	-
3-CQA	1.7	2.3	-
4-CQA	2.2	3.2	-
5-CQA	14.1	13.5	4.4
5-FQA	1.2	1.1	8.4
3,4-diCQA	0.8	0.9	-
3,5-diCQA	1.2	1.0	15.6
Somme polyphénols	21.2	22.0	-

Tableau 21: Teneur en % matière sèche d'un extrait commercial de café vert avant et après le traitement thermique à 100 °C

Composé	Teneur [% DM]		Pertes [%]
	Avant	Après	
Caféine	11.9	4.8	60.2
3-CQA	3.6	3.0	16.8
4-CQA	4.4	3.8	15.6
5-CQA	18.4	12.4	32.5
5-FQA	4.4	1.0	77.1
3,4-diCQA	2.8	1.0	64.2
3,5-diCQA	2.3	0.9	60.6
Somme polyphénols	35.9	22.1	38.4

De manière générale, les teneurs sont plus basses que celles obtenues lors de la dissolution de l'extrait dans une solution méthanolique (tableau 18) mais les différences sont très faibles. Les plus grandes divergences entre les deux essais (dilution dans l'eau et dans la solution méthanolique) se notent pour les teneurs en 5-CQA. Lors du traitement thermique, les plus grandes pertes sont pour la caféine, le 5-FQA et les acides dicaféyl-quiniques avec plus de 40 %. Les essais effectués sur le Robusta et l'échantillon commercial se sont bien déroulés contrairement à celui réalisé sur l'Arabica. En effet, on constate parfois un gain de matière ce qui n'est évidemment pas possible. Ces résultats incohérents peuvent être expliqués par la variation du signal chromatographique ou par une isomérisation des composés due à la chaleur. Cependant, ce fait n'a pas été constaté dans les deux autres échantillons ou si il est survenu, il ne s'est pas fait remarquer de manière significative. Il faudrait alors approfondir le problème dans le but de déterminer les raisons de ces résultats inattendus. Les pertes totales en composés polyphénoliques s'élèvent au maximum à 40 %.

5.12 Process Robusta

L'extraction effectuée dans une cuve avec une masse de café vert de départ de 2 kg a fourni des résultats similaires à ceux qui étaient attendus (Annexe 24). En effet, les teneurs en matière sèche illustrées au tableau 22 sont du même ordre de grandeur que celles présentées dans les points précédents (tableau 18) en ce qui concerne le Robusta.

Tableau 22: Teneur en principes actifs en %
matière sèche

Composé	Teneur [% DM]
Caféine	8.5
3-CQA	2.2
4-CQA	2.7
5-CQA	16.4
5-FQA	3.5
3,4-diCQA	2.2
3,5-diCQA	1.9
Somme polyphénols	28.9

Ainsi, pour les composés considérés, un écart maximal de 0.4 % DM est constaté avec les résultats précédents, ce qui reste presque négligeable. L'écart minimal est fixé à 0.2 % DM.

En outre, le procédé a posé quelques petits problèmes lors du traitement de l'extrait obtenu. Lors de la filtration sur plaques, il a fallu renouveler trois fois ces dernières vu qu'elles se bouchaient assez rapidement à cause de la grande quantité de graisses contenue dans le café vert. Comme tout le système montait en pression il a fallu totalement le vider à chaque obstruction des plaques. Pour récupérer le maximum d'extrait, de l'eau a été introduite dans le filtre ce qui n'a fait que diluer encore plus l'extrait. Le rendement de la filtration a été calculé grâce aux matières sèches des extraits intermédiaires et il est de 70 % (Annexe 24). Une matière sèche de l'extrait filtré n'a pas été calculée à cause de cet effet de dilution. L'extrait a ensuite été concentré à l'évaporateur rotatif puis à l'étuve sous vide pour les derniers litres restants. Cette opération de concentration a duré 13 jours. L'évaporation du solvant a surtout été ralentie par la présence de graisses formant une couche en surface. Lorsque l'extrait était enfin sec, les graisses se sont déposées sur les parois et au fond du bécher. Ces dernières n'ont volontairement pas été récupérées avec l'extrait sec pour procéder à une analyse chromatographique. Notons que l'extrait sec était très volumineux et par conséquent très aéré. Pour une masse d'environ 130 g, ce dernier occupe en volume plus d'un bécher de 2 litres.

L'extrait sec a alors été analysé et les teneurs en composés polyphénoliques et en caféine ont été déterminées (Annexe 24). Ces résultats sont illustrés au tableau 23 et peuvent être aisément comparés à ceux obtenus selon la méthode de l'extraction par solvant accéléré.

Tableau 23: Teneur en % plante sèche de la caféine et de composés polyphénoliques pour Robusta lors de l'ASE et du process et taux de recouvrement

Composé	Teneur [% PS]		Recouvrement p/r ASE	Taux de recouvrement
	ASE	Process	[%]	[%]
Caféine	2.2	1.0	45.5	28.9
3-CQA	0.4	0.2	50.0	31.8
4-CQA	0.6	0.3	50.0	30.7
5-CQA	4.7	2.2	46.8	27.1
5-FQA	0.9	0.4	44.4	28.0
3,4-diCQA	0.5	0.2	40.0	22.8
3,5-diCQA	0.6	0.3	50.0	28.2
Somme polyphénols	7.7	3.6	46.7	-

Le taux de recouvrement par rapport à une extraction par solvant accéléré en ce qui concerne la somme des composés polyphénoliques est de 47 %. Les taux de recouvrement des différentes substances extraites par macération agitée sont très faibles. Notons que dans ce calcul, les taux de recouvrement obtenus par ASE sont considérés. Ces derniers sont illustrés au tableau 14.

5.13 *Activité anti-radicalaire des extraits de café vert*

La mesure de l'activité anti-radicalaire des extraits secs de café vert (tableau 24) s'est effectuée à l'aide d'un test DPPH. (Annexe 25) Le DPPH est un radical de couleur violet intense. La mesure de l'efficacité d'un antioxydant (capacité à fixer des radicaux libres, donc arrêter la propagation de la réaction en chaîne) se fait en mesurant la diminution de la coloration violette, due à une recombinaison des radicaux DPPH [27]. Ce test fourni en fait la concentration effective pour diminuer de 50 % l'activité anti-radicalaire (EC_{50}). Par conséquent, plus la valeur est petite, plus le pouvoir anti-radicalaire est grand.

Tableau 24: Valeurs EC_{50} des extraits secs de café vert

	Robusta	Arabica	Echantillon commercial
EC_{50} [µg/ml]	21.7	26.3	14.6

Ainsi, l'extrait commercial de café vert possède une activité anti-radicalaire plus élevée que les extraits de Robusta qui à leur tour ont un pouvoir antioxydant plus fort que les extraits d'Arabica. Vu que la quantité de composés polyphénoliques responsable de l'activité antiradicalaire est connue dans l'extrait de café (tableau 18) et que l'acide chlorogénique possède une valeur EC_{50} de 6.2 µg/ml [28], si on calcule la valeur EC_{50} de ces composés, cela donne respectivement pour le Robusta, l'Arabica et l'échantillon commercial de 6.5, 6.2 et 5.2 µg/ml ce qui est très proche de la valeur attendue. Il peut alors être conclu que la présence d'autres composés n'affecte pas le pouvoir antiradicalaire des acides chlorogénique.

De plus, les antioxydants primaires ou radicalaires permettent l'interruption de la chaîne autocatalytique: $AH + R^{\cdot} \rightarrow A^{\cdot} + RH$. La molécule AH est antioxydante si le radical formé A^{\cdot} est plus stable. La stabilité du radical A^{\cdot} peut s'expliquer par sa conversion en composés non radicalaires. De plus, l'oxydation est un phénomène irréversible, mais qui peut et doit être ralenti. Parmi les solutions, les meilleures sont sûrement issues de la nature, comme les désormais célèbres tocophérols et polyphénols [27]. Les polyphénols doivent leur activité à, comme leur nom l'indique, un très grand nombre de résidus hydroxyles, qui sont autant de munition pour lutter contre les radicaux libres et stopper la réaction en chaîne.

L'efficacité des pépins de raisins possédant un haut pouvoir antioxydant est à noter car ils sont composés de monomères, de dimères et de molécules encore plus polymérisées (procyanidol B) que celles se trouvant dans le café vert. En effet, plus le produit est purifié en polyphénols (monomères et dimères catéchiques), plus son efficacité antioxydante augmente [27].

En outre, un traitement à haute température des grains de cafés, telle la torréfaction, provoque la perte de l'activité antioxydante des composés polyphénoliques. En effet, ces derniers représentent environ 8 % des grains de café vert et 4 % des grains de café torréfiés [29].

6 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Durant ce travail, les grains de café vert ont été soumis à différents types d'extraction: l'extraction par solvant accéléré de type plutôt analytique et la macération agitée plus facilement applicable en industrie. Il s'est avéré que les paramètres optimaux déterminés pour un type d'extraction n'étaient pas les mêmes pour l'autre. Il a alors été retenu pour les deux types de café, lors des essais traitant de la macération agitée, une concentration en éthanol de 40 %, une température d'extraction de 40 °C ainsi qu'une taille de mouture de 1 mm. Grâce à l'extrait obtenu, le taux de matière sèche extrait à partir des grains de café a été calculé et il est respectivement de 15 et 17 % pour le Robusta et l'Arabica.

Les extraits ont ensuite été concentrés et un produit sec un peu cristallin a été obtenu. Ce dernier a été analysé par HPLC-UV-MS et les composés suivants ont été quantifiés dans les extraits de Robusta, d'Arabica et dans un échantillon commercial d'extrait de café: les 3-, 4- et 5-CQA, le 5-FQA, le 3.4-diCQA et un de ses isomères, le 3.5-diCQA. D'autres substances ont été uniquement détectées mais pas quantifiées car elles sont présentes en très faibles quantités, il s'agit du 3- et 4-FQA. Les quantifications ont été effectuées à partir du standard 5-CQA en utilisant des facteurs de correction pour les FQA et diCQA. Les teneurs ont été rapportées à la plante sèche et à la matière sèche: la quantité minimale de composés polyphénoliques s'élève à 9 % PS et 30 % DM pour le Robusta, 7 % PS et 23 % DM pour l'Arabica. L'échantillon commercial présente une teneur plus élevée en substances antioxydantes de 39 % DM. La caféine a aussi été dosée et elle est contenue en plus grande quantité dans le Robusta que dans l'Arabica.

Comme le Robusta possède des concentrations un peu plus élevées, un process a été mis en place avec ce dernier. Les teneurs de la matière sèche sont très similaires à celles attendues. Les taux de recouvrement sont toutefois peu élevés, de l'ordre de 30 % et le rendement de la filtration faible (70 %).

Etant donné que le but de ce développement est de réintroduire les composés polyphénoliques dans le café une fois torréfié, il est important de savoir si ces derniers résistent à l'eau bouillante utilisée pour préparer un café boisson. Suite aux résultats obtenus, certains composés résistent plus que d'autres au traitement thermique mais leur diminution reste minime.

Ensuite, la valeur EC_{50} des extraits de café vert a été mesurée et il s'est avéré que l'extrait commercial possède une activité anti-radicalaire plus élevée que les extraits de Robusta qui à leur tour ont un pouvoir antioxydant plus fort que les extraits d'Arabica. Notons que la présence d'autres composés n'affecte pas le pouvoir antiradicalaire des acides chlorogéniques.

Finalement, il serait intéressant de poursuivre le travail dans le but de quantifier toutes les substances extraites par le solvant, d'en obtenir des fractions pures, de les concentrer et d'en vérifier la pureté par résonance magnétique nucléaire. Pour ceci, la méthode analytique serait à améliorer car elle ne permet pas pour l'instant de séparer toutes les substances contenues dans les extraits de café vert et à adapter à une méthode d'isolation sur MPLC (chromatographie liquide à moyenne pression). De plus, la raison pour laquelle le test de

stabilité à la température de l'extrait sec d'Arabica n'a pas fonctionné mériterait aussi qu'on s'y attarde afin de définir ce qui le différencie vraiment des autres extraits. Il serait aussi important de vérifier si une modification du goût intervient lorsque les composés polyphénoliques sont introduits dans le café boisson puisque dans la littérature, ces composés provoquent l'amertume et l'astringence du café.

7 REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont tout d'abord au Dr. Urban Frey pour sa disponibilité, son soutien et son intérêt face à ce travail de diplôme. Je tiens aussi à remercier M. Ennio Cantergiani pour les quelques déplacements qu'il a effectué jusqu'à Sion et le Dr. Alain-François –Grogg pour les explications fournies sur les extractions. Merci aussi à Marc Bloch et à Michal Pivnec pour m'avoir accordé un peu de leur temps lors de leur passage à l'HEVs.

Mes remerciements vont aussi aux ingénieurs de l'école en commençant par Pascal Jacquemettaz que je remercie pour sa disponibilité, sa gentillesse, sa générosité, sa bonne humeur ainsi que pour la relecture de mon rapport. Merci aussi à Julien Héritier et à Nadia Marcon pour le coup de main donné lors du process du Robusta ainsi que pour leur disponibilité tout au long de ce travail. Merci à Thierry Udrisard pour m'avoir préparer chaque matin le RC 1. Merci encore à Fabrice Micaux pour les analyses RMN et les explications de spectres. Merci à Lionnel Luginbühl pour m'avoir aidé à manipuler la machine à mettre sous vide. Merci à Laurence Antille pour la relecture de mon travail et les corrections apportées.

Je tiens aussi à remercier toute l'équipe du laboratoire d'analytique à savoir Antoine Fornage, Umberto Piantini, Stéphane Mayor, Yan Rathgeb, Madeleine Darioly, Lukas Dinger, Stephan Koslitz, Stéphane Willen, Bastien Thomas, Alain Marty et Jonathan Morard pour leur bonne humeur et les bons moments passés ensemble.

Enfin, merci à ma consœur Sonja Biner et à ma famille pour m'avoir permis de traverser ces trois mois sereinement.

Sion, le 24 novembre 2006.

Bastian Christèle

8 BIBLIOGRAPHIE

8.1 Publications et ouvrages

- [1] Thorn J., "Le Café, le guide du connaisseur", Modus Vivendi, Canada, 2002.
- [2] Coste R., "Caféiers et cafés", Editions G.-P. Maisonneuve & Larose, Paris, 1989.
- [3] Poisson J., "Aspects chimiques et biologiques de la composition du café vert", VIII^e Colloque Scientifique International sur le Café, Abidjan, ASCI (Paris), 1979, 59-64.
- [4] Dentan E., "Structure fine du grain de café vert", VIII^e Colloque Scientifique International sur le Café, Abidjan, ASCI (Paris), 1977, 33-55.
- [5] Bruneton J., "Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales", 2^e édition, Lavoisier, Paris, 1993.
- [6] Olthof M. R., Hollmann P. C. H. and Katan M. B., "Chlorogenic Acid and Caffeic Acid Are Absorbed in Humans", Journal of Nutrition 131, Netherlands, 2001, 66-71.
- [7] Kondratyuk T. P., Pezzuto J.M., "Natural product polyphenols of relevance to human health", Pharmaceutical Biology 42, USA, 2004, 46-63.
- [8] Kazuya I., Noriaki K., Yukari K., Kyo M. and Tokio F., "In Vitro Antioxidative Effects and Tyrosinase Inhibitory Activities of Seven Hydroxycinnamoyl Derivates in Green Coffee Beans", Journal of Agriculture and Food Chemistry 52, Japon, 2004, 4893-4898.
- [9] De Maria C. A. B., Trugo L. C. and De Mariz L. S e Miranda, "The Content of Individual Caffeoylquinic Acids in Edible Vegetables", Journal of food composition and analysis 12, Brazil, 1999, 289-292.
- [10] Franca A. S., Mendonça J., Oliveira S., "Composition of green and roasted coffees of different cup qualities", LWT 38, Brazil, 2005, 709-715.
- [11] Skoog D.A., Holler F.J., Nieman T.A., "Principe d'analyse instrumentale", De Boeck Université, Bruxelles, 2003.
- [12] De Hoffmann, Charette, Stroobant, "Spectrométrie de masse, cours et exercices corrigés", 2^e cycle, écoles d'ingénieurs, Dunod 2^e édition, Paris, 1999.
- [13] The Merck Index, Twelfth Edition, Merck & Co Inc., Whitehouse station, NJ, 1996.
- [14] Produits chimiques et réactifs analytiques de laboratoire, Fluka Riedel-de Haën, 2005-2006.
- [15] Bastian C., "Développement d'une méthode HPLC pour l'analyse qualitative et quantitative des composés polyphénoliques de *Coffea canephora* var. *robusta*", HEVs, Sion, 19.06.06.
- [16] Ramirez-Coronel M. A., Marnet N., Kolli K. V. S., Roussos S., Guyot S., Augur C., "Characterization and Estimation of Proanthocyanidins and Other Phenolics in Coffee Pulp (*Coffea arabica*) by Thiolytic-High-Performance Liquid Chromatography", Journal of Agriculture and Food Chemistry 52, France, 2004, 1344-1349.
- [17] Smith R. F., "Compte rendu sur la détermination de la teneur en eau du café vert", Second Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Paris, ASCI (Paris), 1965, 27-38.
- [18] Menchu J. F., "La préparation du café vert en vue de l'analyse chimique", Troisième Colloque International sur la Chimie des Cafés Verts, Torréfiés et leurs Dérivés, Trieste, ASCI (Paris), 1967, 86-91.

- [19] Hahn D., "Etude de l'influence éventuelle de la granulométrie du café vert sur la détermination de la teneur en eau par les deux méthodes ISO", V^e Colloque International sur la Chimie des Cafés, Lisbonne, ASCI (Paris), 1971, 112-114.
- [20] Dr Duke's, "Phytochemical and Ethnobotanical Databases", www.sun.ars-grin.gov.
- [21] Jones R. P., "Biological principles for the effects of ethanol", Enzyme Microb. Technol. 11, UK, 1989, 130-152.
- [22] Vincent J.-C., Guenot M.-C., Perriot J.-J., Geule D., "Influence de différents traitements technologiques sur les caractéristiques chimiques et organoleptiques des cafés Robusta et Arabusta", VIII^e Colloque Scientifique International sur le Café, Abidjan, ASCI (Paris), 1977, 271-284.
- [23] Schetty O. et al., "Café et succédanés du café", Manuel Suisse des Denrées Alimentaires, chapitre 35, 5^e édition, 2^e volume II, Berne, 1996.
- [24] Ky C.-L., Noirot M., Hamon S., "Comparison of Five Purification Methods for Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans", Journal of Agriculture and Food Chemistry 45, France, 1997, 786-790.
- [25] Fang N., Yu S., Prior R. L., "LC/MS/MS Characterization of Phenolic Constituents in Dried Plums", Journal of Agriculture and Food Chemistry 50, Arkansas, 2002, 3579-3585.
- [26] Ngoc Ho H., Bastian C., "Détermination par HPLC-UV-MS de la teneur en acide ursolique et oléanolique de *Salvia officinalis*", HEVs, Sion, 03.02.06.
- [27] Rolland Y., "Antioxydants naturels végétaux", OCL 11, France, 2004, 419-424.
- [28] Roup E., "Mise en évidence des propriétés pharmacologiques d'extraits purifiés de *Leontopodium alpinum* Cass", Institut de pharmacognosie et de phytochimie, Ecole de Pharmacie Genève-Lausanne, année universitaire 2004/2005.
- [29] Morishita H., Kido R., "Antioxidant activities of chlorogenic acids", 16^e Colloque Scientifique International sur le Café, Kyoto, ASCI (Paris), 1995, 119-124.

8.2 Brevets

- [A] Zapp L., Andrews A., Johnson L., Slaga B., "Therapeutic preparation from coffee bean and method for producing", n° WO0285397, 2002.
- [B] Kim K., "A pharmaceutical composition having chlorogenic acid as active component for preventing or treating the declining of male reproduction capability", n° WO0166101, 2001.
- [C] Slaga T., Zhao J., Lange M., Zapp L., "Method for enhancing post-processing content of beneficial compounds in beverages naturally containing same", n° US2004151822, 2004.
- [D] Chien M., Hausler A., Van Leersum H., "Taste modifiers comprising a chlorogenic acid", n° WO 20/02100192, 2002.
- [E] Kurausu K., Yannhenriku R., Harutomuuto S., "Use of chlorogenic acid as antioxidant in make-up composition and composition containing chlorogenic acid", n° JP8208419, 1996.
- [F] Li M., Sevenet T., Schaller H., Abdul H., Guenard D., Potier P., Pilleux E., "Depigmenting cosmetic and/or dermatologic composition containing a di- or tri-caffeoylquinic acid or a blend of these acids", n° CA2099473, 1994.
- [G] Lenmann G., Neunhoeffler O., Roselius W., Vitzhum O., "An antioxidant derived from green coffee beans", n° GB1275129, 1972.

- [H] Inami O., Tamura I., "Production of purified chlorogenic acid", n° JP4145049, 1992.
- [I] Kawamura M., Ishikawa Y., Nakahara K., "Method of processing chlorogenic acid-rich coffee beans", n° WO2006080333, 2006.
- [J] Fukuda M., Takahashi H., Konishi A., "Method for producing chlorogenic acid composition", n° WO2006093114, 2006.
- [K] Kummer P., Ciurea I., "Process for decreasing the chlorogenic acid content of green coffee", n° EP0107171, 1984.
- [L] Douwe E., "Removal of caffeine and chlorogenic acids from green coffee", n° ES8602363, 1986.
- [M] Nomura E., Hosoda A., Mori H., Asahi K., Yamazaki M., Taniguchi H., "Method for producing composition containing high concentration of chlorogenic acid", n° JP2005263632, 2005.
- [N] Buchholz K., Goesswein C., Ball M., Hubert P., Kopsch R., "Coffee and process for the production thereof", n° FI874360, 1987.
- [O] Sakano T., Fujii S., "Chlorogenic acid-containing drink", n° JP2005333927, 2005.

9 ANNEXES

- Annexe 1: Pesées effectuées lors de l'optimisation de l'extraction par solvant accéléré
- Annexe 2: Epuisement et matière sèche des extraits
- Annexe 3: Description des paramètres ASE
- Annexe 4: Teneur en eau résiduelle
- Annexe 5: Données concernant la macération utilisée pour la concentration du surnageant
- Annexe 6: Teneurs en principes actifs de la matière sèche
- Annexe 7: Stabilité des composés polyphénoliques et de la caféine à 100 °C
- Annexe 8: Calibration de l'acide chlorogénique et de la caféine
- Annexe 9: Pesées effectuées lors du test DPPH
- Annexe 10: PH des extraits épuisés
- Annexe 11: Optimisation de la teneur en éthanol pour l'ASE
- Annexe 12: Optimisation de la température pour l'ASE
- Annexe 13: Optimisation de la taille de la mouture pour l'ASE
- Annexe 14: Optimisation de la macération agitée pour le Robusta
- Annexe 15: Optimisation de la macération agitée pour l'Arabica
- Annexe 16: Macération agitée à 40 °C avec des morceaux de grains de Robusta
- Annexe 17: Matière sèche exprimée par rapport à l'extrait et par rapport aux grains de café
- Annexe 18: Chromatogrammes et spectres MS en ionisation négative et positive
- Annexe 19: Exemple d'un chromatogramme effectué avec le DAD
- Annexe 20: Explication de la quantification des FQA et diCQA.
- Annexe 21: Epuisement et teneurs en principes actifs (% PS) de Robusta lors de l'ASE
- Annexe 22: Epuisement et teneurs en principes actifs (% PS) de l'Arabica lors de l'ASE
- Annexe 23: Teneurs en principes actifs (% PS) lors des macérations agitées
- Annexe 24: Résultats du process avec Robusta
- Annexe 25: Résultats du test DPPH